

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets<sup>5</sup> : <b>C12N 15/53, 15/82, A01H 5/00</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 93/18154</b> (43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT FR93/00222</b></p>	
<p>(22) Date de dépôt international: <b>5 mars 1993 (05.03.93)</b></p>	
<p>(30) Données relatives à la priorité: <b>92/02658 5 mars 1992 (05.03.92) FR</b></p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).</p>	
<p>(72) Inventeurs: et</p>	
<p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): VINCENTZ, Michel [FR/FR]; 15, passage Sigaud, F-75013 Paris (FR). DORLHAC, François [FR/FR]; 1 bis, rue de la République, F-92190 Meudon (FR). CHUPEAU, Yves [FR/FR]; 13, rue de la Juiverie, F-78550 Richebourg (FR). MORT-GAUDRY, Jean-François [FR/FR]; 21, rue de la Grande-Coudraie, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). CABOCHE, Michel [FR/FR]; 5, rue du Thimerais, F-78310 Maurepas (FR).</p>	

(54) Title: METHOD FOR ENHANCING PLANT PRECOCITY AND/OR REDUCING THE STORED NITRATE CONTENT OF A PLANT

(54) Titre: PROCEDE POUR ACCROITRE LA PRECOCITE D'UNE PLANTE ET/OU ABAISSER LA TENEUR EN NITRATES STOCKES DANS LA PLANTE

(57) Abstract

A method for enhancing plant precocity and/or reducing the stored nitrate content of a plant, wherein an over-expression of nitrate reductase is induced in the plant so as to induce an over-expression of nitrate reductase activity therein.

(57) Abrégé

Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante, de manière à ce qu'on induit une surexpression de l'activité Nitratase Réductase dans la plante.

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.*

*Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: **28 octobre 1993 (28.10.93)**

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures  
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Géhon	MW	Malawi
BB	Banade	CB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	CN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	CR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SI	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00222

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C12N 15/53; C12N 15/82; A01H 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C12N; A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY. Vol. 18, January 1992, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 363-375 DORBE, M-F, ET AL. 'The tomato nia gene complements a Nicotina plumbaginifolia nitrate reductase deficient mutant and is properly regulated', see page 371, left-hand column, paragraph 1 --	1-12
A	THE PLANT JOURNAL, vol. 1, No. 2, September 1991, pages 267-274, NUSSAUML, L., ET AL. 'Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics' see page 268-page 269 --	1-12
		./.

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 August 1993 (30.08.93)Date of mailing of the international search report  
23 September 1993 (23.09.93)Name and mailing address of the ISA/  
European patent Office  
Facsimile No.Authorized officer:  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00222

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

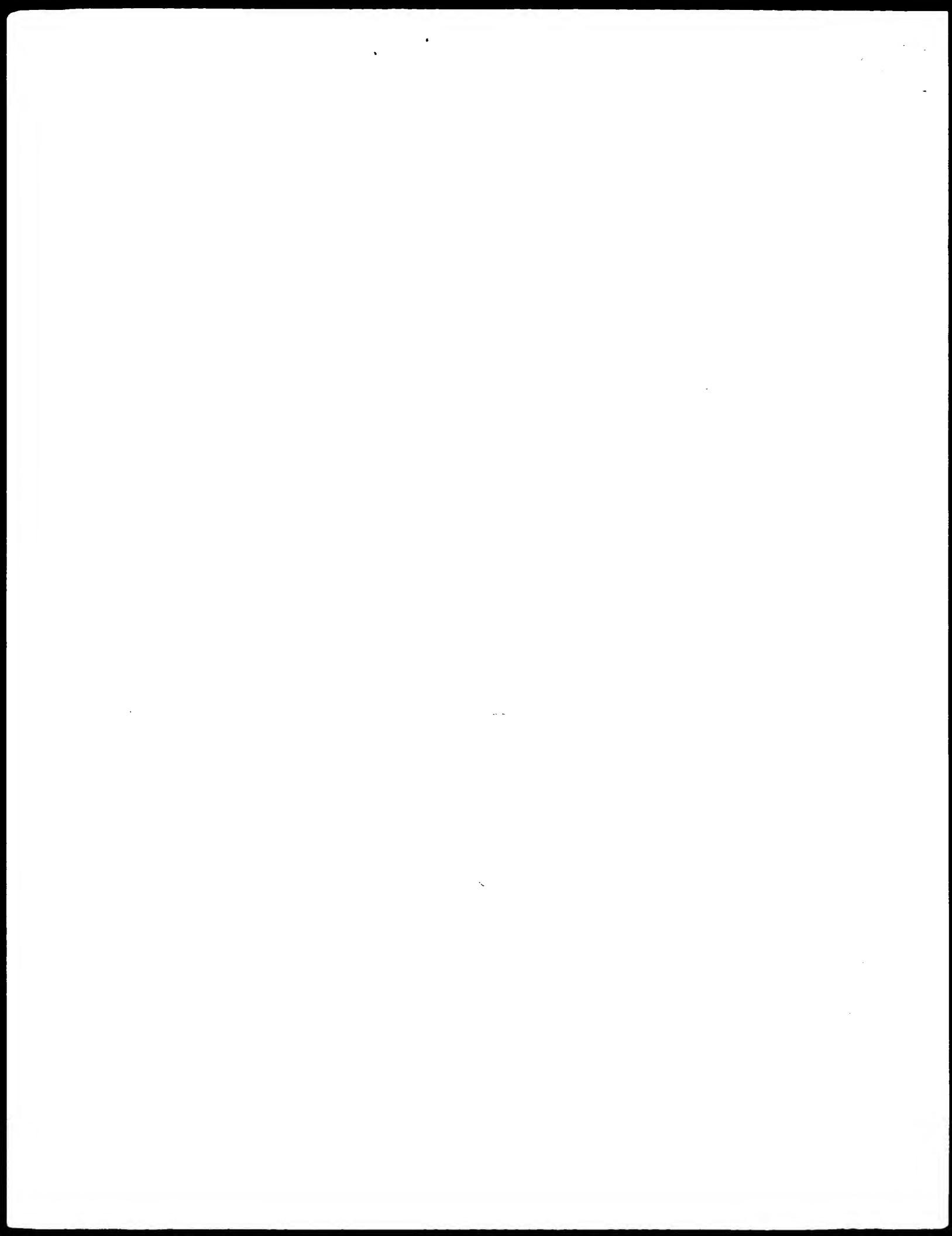
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EMBO JOURNAL, vol. 10, No. 5, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1027-1035, VINCENTZ, M., ET AL. 'Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> plants' cited in the application see the whole document	1-12
A	-- EP, A, 0 283 338 (INRA) 21 September 1988 see page 2, line 19 - line 26	10,11
A	-- WO, A, 9 104 325 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 4 April 1991, see page 26, line 17 - line 27	10
A	-- EP, A, 0 227 909 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 8 July 1987, see page 6, line 37 - line 42	10
A	-- EP, A, 0 303 780 (HOECHST) 22 February 1989 see the whole document	10
A	-- DATABASE WPI, Section Ch, Week 8418, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C03, AN 84-107932 & DD, A, 205 603 (GRAESER) see abstract	10
-----		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9300222  
SA 71734

This annex lists the parent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 30/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)		Publication date
EP-A-0283338	21-09-88	FR-A-	2610948	19-08-88
		FR-A-	2618794	03-02-89
		FR-A-	2649992	25-01-91
-----				
WO-A-9104325	04-04-91	AU-B-	639026	15-07-93
		AU-A-	6359890	18-04-91
		CA-A-	2065873	16-03-91
		EP-A-	0491780	01-07-92
		JP-T-	5500156	21-01-93
-----				
EP-A-0227909	08-07-87	AU-A-	6447386	30-04-87
		JP-A-	1132382	24-05-89
-----				
EP-A-0303780	22-02-89	DE-A-	3719053	15-12-88
		AU-A-	1732188	08-12-88
		JP-A-	1060389	07-03-89
-----				



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00222

Demande Internationale N°

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/53; C12N15/82; A01H5/00

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C12N ; A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 18, Janvier 1992, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 363 - 375 DORBE, M-F, ET AL. 'The tomato nia gene complements a Nicotina plumbaginifolia nitrate reductase deficient mutant and is properly regulated' voir page 371, colonne de gauche, alinéa 1 ---	1-12
A	THE PLANT JOURNAL vol. 1, no. 2, Septembre 1991, pages 267 - 274 NUSSAUME, L., ET AL. 'Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics' voir page 268 - page 269 ---	1-12 -/-

<sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou créé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 AOUT 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23-09-1993

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

MADDOX A.D.

III DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Categorie <sup>15</sup>	Identification des documents cités <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	EMBO JOURNAL vol. 10, no. 5, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1027 - 1035 VINCENTZ, M., ET AL. 'Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of Nicotiana plumbaginifolia plants' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-12
A	EP,A,0 283 338 (INRA) 21 Septembre 1988 voir page 2, ligne 19 - ligne 26 ---	10,11
A	WO,A,9 104 325 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 4 Avril 1991 voir page 26, ligne 17 - ligne 27 ---	10
A	EP,A,0 227 909 (GENERAL HOSPITAL CORP.) 8 Juillet 1987 voir page 6, ligne 37 - ligne 42 ---	10
A	EP,A,0 303 780 (HOECHST) 22 Février 1989 voir le document en entier ---	10
A	DATABASE WPIL Section Ch, Week 8418, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C03, AN 84-107932 & DD,A,205 603 (GRAESER) voir abrégé -----	10

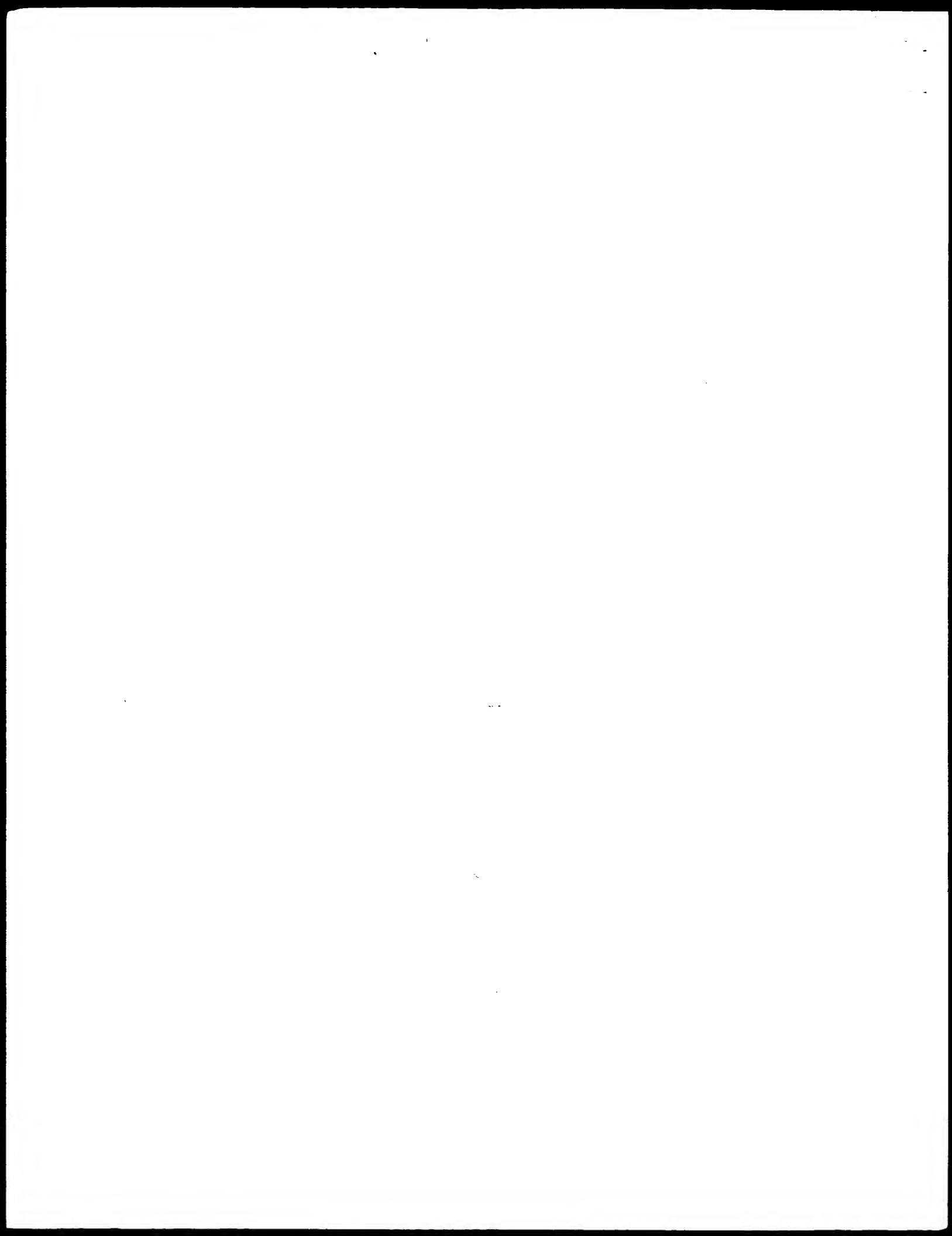
**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300222  
SA 71734

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont conservés au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 30/08/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0283338	21-09-88	FR-A- FR-A- FR-A-	2610948 2618794 2649992	19-08-88 03-02-89 25-01-91
WO-A-9104325	04-04-91	AU-B- AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	639026 6359890 2065873 0491780 5500156	15-07-93 18-04-91 16-03-91 01-07-92 21-01-93
EP-A-0227909	08-07-87	AU-A- JP-A-	6447386 1132382	30-04-87 24-05-89
EP-A-0303780	22-02-89	DE-A- AU-A- JP-A-	3719053 1732188 1060389	15-12-88 08-12-88 07-03-89





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :  C12N 15/53, 15/82, A01H 5/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/18154  (43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00222  (22) Date de dépôt international: 5 mars 1993 (05.03.93)		(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 92/02658 5 mars 1992 (05.03.92) FR		(81) Etats désignés: AU, CA, FI, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).  (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): VINCENTZ, Michel [FR/FR]; 15, passage Sigaud, F-75013 Paris (FR). DORLHAC, François [FR/FR]; 1 bis, rue de la République, F-92190 Meudon (FR). CHUPEAU, Yves [FR/FR]; 13, rue de la Juiverie, F-78550 Richebourg (FR). MORT-GAUDRY, Jean-François [FR/FR]; 21, rue de la Grande-Coudraie, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). CABOCHE, Michel [FR/FR]; 5, rue du Thimerais, F-78310 Maurepas (FR).		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(54) Title: METHOD FOR ENHANCING PLANT PRECOCITY AND/OR REDUCING THE STORED NITRATE CONTENT OF A PLANT			
(54) Titre: PROCEDE POUR ACCROITRE LA PRECOCITE D'UNE PLANTE ET/OU ABAISSER LA TENEUR EN NITRATES STOCKES DANS LA PLANTE			
(57) Abstract			
A method for enhancing plant precocity and/or reducing the stored nitrate content of a plant, wherein an over-expression of nitrate reductase is induced in the plant so as to induce an over-expression of nitrate reductase activity therein.			
(57) Abrégé			
Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante, de manière à ce qu'on induit une surexpression de l'activité Nitrase Réductase dans la plante.			

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	CA	Ganée	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	CR	Grèce	NZ	Nouvelle Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Malte	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

PROCEDE POUR ACCROITRE LA PRECOCITE D'UNE PLANTE ET/OU  
ABAISSEZ LA TENEUR EN NITRATES STOCKES DANS LA PLANTE

La présente invention concerne un procédé d'amélioration de la précocité de plantes, notamment des plantes supérieures. La présente invention concerne également un procédé d'abaissement de la teneur en nitrates stockés dans les plantes, notamment au niveau foliaire le cas échéant.

Les espèces cultivées ont un cycle de reproduction dont la durée limite souvent l'utilisation dans les régions septentrionales. En effet, la récolte de l'espèce doit pouvoir être effectuée avant le retour de mauvaises conditions météorologiques. Dans de nombreux exemples, la 10 maturation des organes récoltés et des graines ne peut être obtenue en temps utile et rend nécessaire la récolte avant maturité, ou compromet la récolte. Ainsi de nombreuses espèces telles que le soja ne sont cultivées qu'au dessous de certaines latitudes pour cette raison. Par ailleurs des espèces déjà cultivées en zones septentrionales, ou en altitude, gagneraient 15 à avoir un cycle plus court pour les mêmes raisons.

On remédie classiquement à ce type de problème, soit en utilisant des conditions de culture artificielles (culture en serre), méthode exploitable pour des cultures maraîchères, soit en sélectionnant pour une précocité accrue. Un gain de précocité peut être obtenu, soit en raccourcissant la durée de la phase de croissance végétative, soit en accélérant l'induction florale, soit enfin en facilitant la maturation des fruits ou graines à récolter. En général, la durée de la phase de croissance végétative apparaît contrôlée par un ensemble complexe de gènes, et se comporte comme un caractère quantitatif. Il n'y a pas d'indication d'un lien 20 de causalité entre cette durée et un aspect particulier du métabolisme de la plante.

Le but de la présente est de fournir un procédé permettant de raccourcir la durée de la phase végétative, et donc d'obtenir un gain de précocité.

On entend donc, dans la présente demande comme dans le domaine technique de la présente invention, par "précoces" des variétés dont la durée entre la mise en terre de la graine et la récolte ultérieure est réduite. Une "précocité accrue" implique une durée de la phase de croissance de la plante plus brève qui conduit à une floraison et une 30 maturation des fruits ou graines à récolter avancées dans le temps par rapport à la normale.

Un autre but de la présente invention était d'abaisser la teneur en nitrate de certaines plantes, notamment au niveau foliaire. Le taux élevé de nitrates peut en effet induire des risques pour la santé ainsi que des désagréments au plan des propriétés organoleptiques de certaines plantes, en particulier pour les épinards, la laitue, ou la carotte. C'est pourquoi les teneurs en nitrate, dans les plantes comestibles, sont maintenant réglementées dans de nombreux pays.

La Nitrate Réductase est une enzyme clé connue pour entrer en jeu dans la première étape de l'assimilation du nitrate dans les plantes.

Le nitrate est la plus importante source d'azote pour les plantes supérieures. Le nitrate est absorbé par les racines, transporté dans divers tissus de la plante, puis réduit en ammoniacal en deux étapes. La première étape exige l'enzyme Nitrate Réductase (NR) qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite dans le cytoplasme. Dans une seconde étape, le nitrite est ensuite réduit dans le chloroplaste par la Nitrite Réductase. La réduction du nitrate est considérée comme une étape de contrôle majeure dans l'assimilation du nitrate et elle a été étudiée en détail chez les plantes supérieures (Wray, 1986). La NR est un homodimère portant trois cofacteurs, à savoir FAD, cytochrome b<sub>557</sub> et un cofacteur molybdoptérine (Campbell, 1988).

L'introduction dans une plante du gène de la NR a été proposée pour modifier les caractéristiques d'assimilation des nitrates par les plantes de manière prospective ou speculative mais sans qu'aucune application concrète n'ait pu être effectivement trouvée jusqu'à ce jour.

Dans tous les cas, l'utilisation était toujours limitée à la modulation de l'assimilation des nitrates dans le temps, c'est-à-dire suivant le stade de développement de la plante, ou dans l'espace, c'est-à-dire pour favoriser l'assimilation au niveau des racines, des tubercules ou foliaire.

On a découvert de façon inattendue que la surexpression de la Nitrate Réductase dans les plantes transgéniques dans lesquelles un gène de NR a été introduit permettait d'une part d'abaisser de manière significative les teneurs en nitrate stockées sous forme de réserve dans la plante et, d'autre part se traduisait par une précocité plus grande, avec un gain de précocité de germination, une croissance accrue et une floraison plus précoce, c'est-à-dire un développement végétatif de la plante plus rapide qui la fait aboutir à floraison avec une avance d'environ deux semaines par rapport aux plantes témoins.

Une incidence de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la précocité est inattendue. Il n'y a pas de travaux qui portent sur de telles études dans la littérature. Chez les céréales, une incidence éventuelle de la quantité de Nitrate Réductase sur les rendements a été étudiée par de nombreux auteurs (Clark, 1990). Toutefois, à l'occasion de ces études, il n'a pas été noté de relation évidente entre l'expression de l'enzyme et la précocité.

Les travaux récents de génétique n'ont pas non plus permis d'établir de relations directes entre la quantité de Nitrate Réductase exprimée au niveau foliaire et le transport ou le stockage du nitrate dans diverses espèces. L'étude de mutants déficients pour l'enzyme Nitrate Réductase de *Nicotiana plumbaginifolia* (Saux et coll., 1987) ou d'orge (Warner et Huffaker, 1989) a établi que ces mutants accumulent du nitrate au niveau foliaire à un niveau comparable aux plantes témoins capables d'assimiler le nitrate. La Nitrate Réductase n'est donc pas nécessaire au transport du nitrate. Par ailleurs, divers travaux d'étude du contrôle génétique de la teneur en nitrate, réalisés par Ostrem et Collins (1983) chez le tabac, et par Blum-Zandstra et Eenink (1986) chez la laitue ont abouti à la conclusion qu'il n'y avait pas non plus de corrélation nette entre la teneur en nitrate foliaire et la quantité de Nitrate Réductase foliaire. Cette absence de corrélation a été expliquée par le fait que la Nitrate Réductase étant elle-même inducible par le nitrate (Crawford, 1989), l'accumulation ou la réduction de la teneur en nitrate peuvent s'accompagner d'une augmentation ou d'une réduction corrélative de la quantité de cette enzyme dans les tissus, par effet rétroactif. Par contre, divers auteurs ont émis l'hypothèse que ce serait le besoin de la plante en osmoticum qui pourrait gouverner ses caractéristiques de stockage du nitrate, et non pas l'utilisation du nitrate par la Nitrate Réductase. La réduction de la teneur en nitrate et la précocité accrue des plantes qui surexpriment la Nitrate Réductase apparaissent donc inattendues.

Dans un cas comme dans l'autre, le mécanisme et les justifications théoriques manquent pour expliquer ces propriétés.

La présente invention a donc pour objet un procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de l'enzyme Nitrate Réductase dans la plante. En d'autres termes, on induit 5 une surexpression de l'activité Nitrate Réductase dans la plante.

On entend ici par "Nitrate Réductase" (NR) une définition fonctionnelle qui inclut toute Nitrate Réductase capable de fonctionner comme un marqueur de sélection en conférant l'activité Nitrate Réductase à une cellule hôte déficiente en Nitrate Réductase. Cette définition inclut 10 aussi toute Nitrate Réductase capable de fonctionner dans une plante donnée pour accroître l'activité Nitrate Réductase de ladite plante. Ce terme inclut donc non seulement l'enzyme spécifique de la plante spécifique à traiter mais toute autre enzyme Nitrate Réductase d'autres plantes, de microbes ou même d'autres espèces eucaryotes, si cette Nitrate Réductase est capable de fonctionner dans les plantes à traiter. 15

On entend par "surexpression" aussi bien une augmentation du taux d'activité de NR par rapport au taux exprimé dans une plante normale, qu'une dérégulation de l'expression conduisant à l'expression de l'activité NR dans un tissu ou à un stade de développement où celle-ci n'est 20 normalement pas exprimée.

L'obtention de plantes exprimant de façon dérégulée la Nitrate Réductase peut être obtenue par différentes approches :

- 1) En sélectionnant des mutants de la plante à améliorer, mutants surexprimant la Nitrate Réductase ;
- 2) En introduisant par les méthodes du génie génétique un gène de Nitrate Réductase éventuellement modifié de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante à améliorer ;

30

35

- 3) En introduisant simultanément par les méthodes du génie génétique un gène de Nitrate Réductase et un gène de Nitrite Réductase éventuellement modifiés de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression dérégulée simultanée de ces deux enzymes dans la plante à améliorer.
- 4) En introduisant par les méthodes du génie génétique un gène de régulation de l'expression de la Nitrate Réductase et de la Nitrite Réductase éventuellement modifiés, de façon appropriée à obtenir la modification de l'expression, et de préférence la surexpression dérégulée conjointe de la Nitrate Réductase et de la Nitrite Réductase dans la plante à améliorer.

10 Ces plantes pourront être modifiées par les méthodes du génie génétique décrites dans la littérature, par transformation de cellules suivie de leur régénération, ou par transformation de tissus ou de gamètes.

15 Dans un mode préféré de réalisation du procédé de l'invention, caractérisé en ce qu'on introduit dans le génome de la plante un gène étranger codant pour la Nitrate Réductase dans des conditions permettant son expression.

20 On entend par "gène fonctionnel codant pour la NR" une séquence d'ADN codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus comme "Nitrate Réductase". ladite séquence peut donc être plus courte ou plus longue que la séquence codante totale du gène complet de l'enzyme. En particulier, le "gène fonctionnel" pourra correspondre à une séquence codante partielle à savoir dépourvue des introns.

25 Le gène étranger est en général un gène hétérologue, c'est-à-dire qui provient d'un organisme d'une espèce différente que la cellule hôte, le gène codant pour un polypeptide ordinairement non produit par la plante dans le génome de laquelle il est introduit.

30 Le gène étranger introduit dans le génome de la plante peut aussi être un gène homologue au gène endogène c'est-à-dire dont l'expression produit la Nitrate Réductase ordinairement produite par la plante.

Par "conditions permettant son expression", on entend que le gène codant la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle d'éléments assurant son expression.

En particulier, la séquence d'ADN codant pour la Nitrate Réductase est associée à une séquence régulatrice appropriée pour sa transcription et sa traduction (ci-après régulon) tels que des promoteurs, y compris des codons start et stop, des "enhancer", des opérateurs. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces promoteurs sont bien connus de l'homme du métier.

Selon un autre mode de réalisation, on peut se contenter d'agir sur la régulation du gène endogène de la Nitrate Réductase en modifiant les gènes de régulation qui contribuent à son expression de manière à ce qu'ils induisent une surexpression de Nitrate Réductase endogène du fait de ces modifications, en particulier, on place le gène de la Nitrate Réductase sous le contrôle d'un promoteur hétérologue fort fonctionnel dans la plante transformée.

Par ailleurs, on a découvert selon la présente invention que le promoteur endogène des gènes de Nitrates Réductases de plante nécessite la présence de sucre pour être activé et induire l'expression de la Nitrate Réductase, la teneur en sucre dans la plante constitue dès lors un facteur limitant, en particulier aux faibles intensités lumineuses.

C'est pourquoi, avantageusement, lorsqu'on place le gène de la Nitrate Réductase endogène ou étranger sous le contrôle d'un promoteur hétérologue, de préférence, le promoteur hétérologue utilisé ne sera pas dépendant de la teneur en sucres.

Ainsi, le promoteur 35S du CaMV (Kay, Chan, Daly et McPherson, 1987), ou le promoteur du gène codant pour le facteur d'elongation de la traduction (Curie et coll. 1991), ou tout autre promoteur dont le fonctionnement ne dépend pas de la présence de sucre sont-ils utilisés avantageusement à cet effet. De même, de façon appropriée, des promoteurs inductibles par une carence en assimilats carbonés dérivés de la photosynthèse pourront être employés.

C'est pourquoi également, selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, on se contente d'augmenter la teneur en sucre dans la plante pour favoriser l'expression de la Nitrate Réductase endogène sans introduire de gène étranger.

Comme gène hétérologue codant pour une Nitrate Réductase, on peut citer en particulier des gènes de plantes, notamment dicotylédones, comme le tabac (Vaucheret et coll. 1989), la tomate (Daniel-Vedele et coll. 1989), *Arabidopsis* (Crawford et coll. 1988), le haricot (Hoff, Stummamn, et Henningssen, 1991) ou monocotylédones comme l'orge (Kleinhofs et coll. 1988) et le riz (Chol, Kleinhofs et An, 1989).

Il doit donc être bien entendu que l'invention implique non seulement l'utilisation des ADNc codant la Nitrate Réductase provenant notamment de plantes, mais aussi toute séquence d'ADN équivalente, 10 c'est-à-dire qui diffère de la séquence d'ADNc seulement par une ou plusieurs mutations neutres, c'est-à-dire dont le changement ou la substitution de nucléotides en cause n'affecte pas la séquence primaire de la protéine résultante.

La présente invention implique aussi l'utilisation de séquences 15 d'ADN complémentaires aux séquences mentionnées ci-dessus, en particulier qui présentent une homologie suffisante avec une séquence d'ADNc complémentaire de l'ARNm d'une Nitrate Réductase, de telle sorte qu'elles s'hybrident avec ladite séquence d'ADNc à 80% dans des conditions stringentes.

En fait, les Nitrates Réductases des différentes espèces dicotylédones présentent une grande homologie. Ainsi, la Nitrate Réductase de tomate présente environ 90% d'homologie avec la Nitrate Réductase de tabac et la séquence d'ADN codant la Nitrate Réductase de tomate présente une homologie de plus 80% (environ 81%) avec la séquence d'ADN 25 codant la Nitrate Réductase de tabac.

Les Nitrates Réductases sont caractérisées en particulier par la présence des acides aminés invariants suivants (Daniel-Vedele, Dorbe, Caboche, et Rouzé, 1989) dans la séquence codante de l'enzyme (positions fournies par rapport à la séquence en acides aminés de la Nitrate Réductase de tabac) :

- Séquence CAGNRRKE des acides aminés 180 à 187 du domaine de fixation du cofacteur à molybdène de l'enzyme,
- Séquence HPGG des acides aminés 564 à 567 du domaine cytochrome b<sub>5</sub> de l'enzyme.

35

- Séquence GLP des acides aminés 677 à 679 du domaine cytochrome b<sub>5</sub> réductase de l'enzyme.

Les demandes de brevet EP 283 338 et EP 409730 décrivent ces séquences d'ADN codant pour la Nitrate Réductase de tabac et de tomate respectivement.

Ledit gène fonctionnel codant pour la Nitrate Réductase peut être introduit dans des cellules de plantes selon des techniques connues. On pourra utiliser avantageusement dans ce cas, mais non obligatoirement le régulon constitutif du gène de la Nitrate Réductase.

On peut citer, tout d'abord, les méthodes de transfert direct de gènes telles que la micro-injection directe dans des cellules d'embryon de la plante (Neuhau et Coll., 1987) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1988) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules (McCabe et Coll., 1988)..

On peut aussi infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'Agrobacterium tumefaciens selon une méthode éprouvée (Schell et Van Montagu, 1983) ou d'Agrobacterium rhizogenes notamment pour les espèces récalcitrantes à la transformation (Chilton et Coll., 1982).

La souche bactérienne comportera le gène codant pour la Nitrate Réductase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. La souche pourra être transformée par un vecteur dans lequel est inséré le gène codant la Nitrate Réductase sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. Ce gène sera inséré par exemple dans un vecteur binaire tel que pBIN19 (Bevan, 1984) ou pMON 505 (Horsch et Klee, 1986) ou tout autre vecteur binaire dérivé des plasmides T1 et R1. Il pourra aussi être utilement introduit par recombinaison homologue dans un plasmide T1 ou R1 désarmé, tel que pGV 3850 (Zambryski et coll., 1983) avant la transformation de la plante.

A titre de vecteur d'expression comprenant le gène fonctionnel de la Nitrate Réductase selon l'invention, on peut citer les vecteurs comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de réPLICATION telle que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus, etc. On utilisera de préférence toutefois des plasmides.

Lorsque l'on introduit un gène fonctionnel codant pour une Nitrate Réductase dans le génome de la plante, ce sera de préférence sous le contrôle de promoteur hétérologue.

A titre illustratif, on peut citer à cet effet des promoteurs constitutifs, comme celui du facteur d'elongation de la traduction (Curie et coll., 1991), des promoteurs tissus spécifiques comme celui de la patatine exprimé dans les tubercules (Rocha-Sosa et coll., 1989), ou comme celui de la petite sous-unité de la ribulose-bis-phosphate décarboxylase exprimés dans les feuilles (Thomson et White, 1991), ou dérivés de virus végétaux comme le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ou CaMV (Kay, Chan, Daly et McPherson, 1987) ou dérivés de l'ADN-T des Agrobactéries ou toute source de promoteur fonctionnel dans la plante transformée.

Dans les exemples ci-après, donnés à titre purement illustratif, le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est dérivé du gène Nia 2 de la Nitrate Réductase du tabac décrit dans la Figure 3 (Vaucheret et coll., 1989) et le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans le plasmide pBIN 19.

Enfin, la présente invention a également pour objet des plantes transgéniques à précocité accrue et/ou teneurs en nitrates stockés réduites obtenues par le procédé selon l'invention.

On cite comme plantes transgéniques selon l'invention toutes plantes potagères cultivées en serres ou en champs, et notamment le tabac, la laitue, l'épinard, la carotte, les différentes variétés de choux.

Les caractéristiques des plantes exprimant de manière dérégulée la Nitrate Réductase conjointement ou non avec l'expression dérégulée de la Nitrite Réductase selon l'invention sont un gain de précocité de germination, une croissance accrue et une floraison plus précoce.

En outre, cette expression dérégulée se traduit par des caractéristiques supplémentaires telles que :

- une baisse de la teneur en nitrate dans les tissus de la plante, et
- 30 - de conférer aux plantes obtenues une caractéristique qui permet de les distinguer aisément des plantes non modifiées du fait de la sensibilité accrue au chlorate des plantes modifiées.

Le chlorate est utilisé comme défoliant. Un traitement au chlorate s'avère utile en préalable à la récolte de certaines plantes à maturité comme le coton.

15 Ainsi, on peut, grâce au procédé de l'invention, utiliser le chlorate à des doses moins importantes pour induire la défoliation des plantes modifiées selon l'invention si ce traitement s'avère utile.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée du mode de réalisation suivant.

10 La Figure 1 représente l'étude comparée de la croissance de la descendance du tabac transformé 3051 PBD6, cultivée *in vitro*. Le nombre moyen de feuilles par plantule (Ordonnée) a été mesuré et représenté en fonction du nombre de jours écoulés après le semis (Abscisse).

15 La Figure 2 représente la croissance en serre et floraison de plantes surexprimant ou non la Nitrate Réductase. Ces plantes ont été repiquées en serre au même stade de développement et cultivées dans les mêmes conditions expérimentales.

La Figure 3 représente la séquence du gène dérivé de Nia2 de la Nitrate Réductase de tabac privé de ses introns.

20 La Figure 4 représente la teneur en ions nitrate des différents étages foliaires de la lignée 30.51.2 PB D6. Les plantes ont été cultivées en champ en présence de 400 kg d'azote à l'ha.

25 La Figure 5 représente la teneur en ions nitrate des différents étages foliaires de la lignée 34.2.5 BB 16. Les plantes ont été cultivées en champ en présence de 400 kg d'azote à l'ha.

#### EXEMPLE 1

##### Effet de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la précocité du tabac

30

Des gènes recombinants dérivés du gène de la Nitrate Réductase de tabac (Brevet Européen EP 283 338) ont été initialement réalisés selon une procédure classique décrite par Vincentz et Caboche

35

(1991) afin de compléter des mutants de *N. plumbaginifolia* déficients pour la Nitrate Réductase. Ces gènes sont constitués de la manière suivante. La séquence codante de la Nitrate Réductase (ADNr dérivé du messager d'origine *Nia2*) précédée ou non de la séquence 5' non traduite de ce transcript, et suivie de séquences d'arrêt de la transcription dérivée d'un des gènes de la Nitrate Réductase du tabac, ou du CaMV a été placée sous le contrôle du promoteur fort de l'ARN 35S du CaMV.

Dans le présent exemple, ce gène a été inséré dans un plasmide vecteur binaire pBin19 (BEVAN, 1984) et introduit selon une procédure classique dans le génome de tabacs industriels, variétés PBD6 et BB16, par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA 4404) (Hoekema et al., 1983). La transformation a été réalisée par inoculation de disques foliaires d'une surface moyenne de 5 cm<sup>2</sup>. Le plasmide pBin19 portant le gène NPTII (néomycine phosphotransférase) conférant la résistance à la kanamycine après transformation, les transformants ont été sélectionnés pour leur aptitude à se développer sur une dose de 100 mg/l de cet antibiotique. Sur un total de 125 explants inoculés pour la variété BB16, et 190 explants pour la variété PB D6, le nombre de plantes transformées obtenues s'élève respectivement à 10 et 281. Parmi ces plantes, certaines peuvent atteindre un niveau d'activité Nitrate Réductase six fois supérieur à celui observé pour le type sauvage. Les caractéristiques de germination et de croissance de deux transformants qui surexpriment la Nitrate Réductase ont été présentées ici et sont représentatives.

Etude de la croissance *in vitro* de la descendance du transformant 30.51

Ce transformant obtenu à partir du génotype PBD6, surexprime approximativement 600% du niveau de la Nitrate Réductase du témoin non transformé. Sa descendance a été récoltée et étudiée. Après stérilisation en surface pendant 40 minutes dans une solution de 800 ml d'eau contenant un comprimé de Bayrochlore de 1 ml de Teepol, puis un rinçage par trois fois dans 800 ml d'eau stérile, les graines ont été semées sur du milieu de bouturage contenant 20 mM de nitrate. 12 graines de cette plante, ainsi qu'un nombre identique du type sauvage ont ainsi été cultivés

in vitro dans des tubes, puis placés dans des chambres de culture dont la température est maintenue à 25°C et le degré hygrométrique à 65% ; l'éclairage de ces chambres est assuré par des tubes fluorescents type "blanc industrie" Philips 40W, assurant une intensité lumineuse de 60E m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16 heures par jour. La Figure 1 montre que la descendance du transformant germe significativement plus précocement que celle du témoin non transformé. Une moyenne effectuée sur chaque lot révèle que la descendance de la plante transformée germe 9 jours avant celle du type sauvage.

10 Etude de la croissance de la descendance du transformant primaire 30.1 BB16

Les graines issues de la plante 30.1 BB16 (transformant primaire surexprimant le gène de la Nitrate Réductase à un niveau trois fois supérieur au témoin non transformé) ont été semées sur de la tourbe et 15 alimentées par la solution nutritive de Coïc et Lesaint, contenant 20 mM de nitrate comme source azotée. 10 plantes ont ainsi été disposées en serre sous un éclairage de 16 heures par jour. Il ressort de leur étude (Figure 2) que les plantes surexprimant constitutivement le gène de la Nitrate Réductase (telles que la plante 30.1.10 prise comme exemple) voient leur floraison accélérée de 10 jours par rapport aux plantes du type sauvage (WT.2 et 30.1.9, cette dernière plante étant une plante du type sauvage ne surexprimant pas la Nitrate Réductase et ne résistant pas à la kanamycine, ayant ségrégué dans la descendance du transformant primaire).

25

EXEMPLE 2

Etude de la sensibilité au chlorate des plantes transgéniques exprimant constitutivement le gène de la nitrate réductase

Des semis en terrine de descendants homozygotes du 30 transformant 30.5IPBD6 ont été effectués parallèlement à des semis témoins. Ces terrines ont été arrosées avec une solution contenant 0.5 mM, 1.5 mM, 5 mM ou 10 mM de chlorate de potassium dix jours après le semis.

35

au stade deux feuilles. Alors que les plantes témoins manifestent les symptômes de chlorose puis de brûlure foliaire caractéristiques de l'effet du chlorate uniquement aux doses de 5 et 10 mM, les plantes transgéniques sont tuées dès la dose la plus faible de chlorate employée (0,5 mM).

5

### EXEMPLE 3

#### Effet de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la teneur foliaire en nitrate chez *Nicotiana plumbaginifolia*

10

La séquence codante de la Nitrate Réductase (ADNc dérivé du messager d'origine Nia2) précédée de la séquence 5' non traduite de ce transcript, et suivie de séquences d'arrêt de la transcription dérivées du gène Nia2 de la Nitrate Réductase du tabac a été placée sous le contrôle du promoteur fort de l'ARN 35S du CaMV. Dans le présent exemple, ce gène a été inséré dans un plasmide vecteur binaire pBin19, et introduit dans le génome du mutant E23 de *Nicotiana plumbaginifolia* déficient pour le gène de structure de la Nitrate Réductase selon une procédure classique décrite dans l'exemple 1. Un transformant, C1, exprimant une activité Nitrate Réductase de 29 nM de nitrite par minute et par mg de protéines totales, soit 178% du témoin sauvage a été étudié. Des plants de *Nicotiana plumbaginifolia* sauvages ou du transformant C1 ont été cultivés en serre, à l'I.N.R.A. de Versailles au cours de l'automne 1990.

20

a) Au cours du premier essai (7/09 au 7/11/90), les plantes ont été placées sur un mélange tourbe/argile et arrosées 2 fois par 24 h par une solution nutritive complète nitroco-ammoniacale (430 ml par plante et par jour), contenant soit 10,2 mM de nitrate et 1,8 mM d'ammonium soit 15,3 mM de nitrate et 2,7 mM d'ammonium. L'éclairage naturel a été complémenté par un éclairage d'appoint assurant de l'ordre de 100 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR pendant 16 h (lampes phytoclaude). La récolte a eu lieu au stade début floraison. Des analyses ont été pratiquées sur 4 plantes prises au hasard parmi les 28 plantes cultivées, par génotype et par type de condition de culture.

35

5 b) Au cours du second essai (25/10/90 au 30/01/91), les plantes ont été placées sur sable inerte et arrosées toutes les 15 minutes pendant 24 h. par une solution nutritive complète (9,6 l par plante et par jour) contenant soit 1 mM de nitrate seul, soit 12 mM de nitrate seul.

10 5 L'éclairage naturel a été complémenté par un éclairage d'appoint identique à celui de l'essai précédent mais pendant 12 h. Les plantes ont été récoltées au stade rosette, les analyses ont été pratiquées sur un échantillon moyen regroupant 4 plantes prises au hasard parmi les 14 plantes cultivées, par génotype et par type de condition de culture.

15 Les analyses pratiquées après récolte montrent les tendances suivantes (voir tableau ci-joint) :

1) La teneur en nitrate est beaucoup plus faible chez les plantes transformées que chez les plantes témoins (de -30% à -70%) ;

15 2) La teneur en azote réduit est plus élevée chez les plantes transformées. Il est à noter qu'il existe un seuil maximal correspondant à 4,5% d'azote réduit chez tous les types de plantes quel que soit le type de nutrition azotée :

3) La teneur en azote protéique est la même chez les plantes transformées et témoins ;

20 4) La teneur en azote total chez les plantes transformées est légèrement plus faible que chez les plantes témoins ;

5) Le type de nutrition azotée (en quantité et en qualité) modifie la teneur en composés azotés par plante mais ne semble pas avoir d'effet sur le comportement général des plantes.

25 En conclusion, les plantes transformées accumulent beaucoup moins d'azote sous forme nitrrique que les plantes témoins. Les plantes transformées accumulent l'azote sous forme réduite. Cet excès d'azote réduit interne pourrait être l'une des causes de la plus forte teneur en matière sèche (M.S.) ainsi que de la moindre production de biomasse fraîche 30 et sèche (de -15% à -30%) observées chez les plantes transformées.

EXEMPLE 4

## Rôle du sucre dans l'expression de la Nitrate Réductase

Des plantes de *Nicotiana plumbaginifolia* sauvages et C1 identiques à celles décrites dans l'exemple 3 ont été repiquées au stade 4 feuillets, cultivées trois semaines en serre, à l'I.N.R.A. de Versailles au cours de l'automne 1990 dans un terreau arrosé par une solution nutritive complète nitroco-ammoniacale, contenant 12 mM de nitrate et 2 mM d'ammonium. Les plantes ont été transférées dans une chambre de culture pendant 6 jours et soumises à une photopériode de 16 heures à 25°C, avec un éclairement de  $130 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR pendant 16 h (lampes phytoclade) suivie de 8 heures d'obscurité à 16°C. Les plantes ont ensuite été placées à l'obscurité durant 72 heures, tout en restant alimentées par la solution nutritive. À ce stade, des analyses ont été pratiquées sur les feuilles de 4 plantes prises au hasard par génotype témoin ou C1. Le niveau de transcrit Nitrate Réductase a été mesuré par la méthode de northern (Thomas, 1980) dans ces feuilles. Cette quantité de transcrit décroît d'un facteur 20 à 50 dans les plantes témoins placées à l'obscurité, alors qu'elle décroît seulement de 50% dans les plantes C1, placées dans les mêmes conditions. Les feuilles prélevées sur ces plantes témoin, maintenues à l'obscurité et dont le pétiole est plongé durant quatre heures dans une solution de conservation (Chlorure de potassium 40 mM, et chlorure de calcium 10 mM) contenant 0.2% de glucose accumulent à nouveau du transcrit Nitrate Réductase à un niveau approximatif de 25% par rapport aux conditions initiales précédant le transfert à l'obscurité. Par contre, cette accumulation n'est pas observée pour des feuilles témoins maintenues à l'obscurité dont le pétiole est plongé dans la solution de conservation sans glucOSE. Dans les plantes C1, le niveau de transcrit Nitrate Réductase reste élevé aux diverses étapes de l'expérience, montrant que la réduction du niveau de transcrit Nitrate Réductase dans les plantes témoins ne résulte pas d'un ralentissement général du métabolisme dû à la carence en sucre. La teneur en sucre apparaît donc comme un signal important pour l'expression du gène non modifié de la Nitrate Réductase, et peut donc constituer un facteur limitant de cette expression aux faibles intensités lumineuses.

T A B L E A U - I

TENUE FOULIÈRE EN AZOTE TOTAL, NITROIQUE, RÉDUIT OU PROTÉIQUE DE PLANTES  
S'EXPRESSANT DE FAÇON DÉRÉGULÉE LA NITRATÉ REDUCTASE

	N total 1 M.S.	N O <sub>3</sub> 1 M.S.	N réduit 1 M.S.	N protéique 1 M.S.	N.M.S. kg/plante
<b>Essai 1</b>					
solution nutritive :					
10,2 mM NO <sub>3</sub> + 1,8 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>					
Témoin	4,09	1,11	2,98	2,07	19,5
Transformé	4,03	0,67	3,36	2,12	16,6
solution nutritive :					
15,3 mM NO <sub>3</sub> + 2,7 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>					
Témoin	4,56	1,78	2,78	2,21	8,2
Transformé	3,80	0,53	3,27	2,17	11,6
<b>Essai 2</b>					
solution nutritive :					
1 mM NO <sub>3</sub>					
Témoin	5,51	1,09	4,42	2,32	5,9
Transformé	5,03	0,62	4,41	2,92	6,5
solution nutritive :					
12 mM NO <sub>3</sub>					
Témoin	6,06	2,14	1,97	1,89	6,0
Transformé	5,90	1,69	6,41	2,04	6,7

\* calcul N réduit : N total - NO<sub>3</sub>

EXEMPLE 5

**Effet de la surexpression de la Nitrate Réductase sur la teneur foliaire en nitrate chez *Nicotiana tabacum***

5      Au cours d'un essai, les plantes ont été disposées en trois blocs, comprenant chacun 8 parcelles de 48 plantes ayant reçu pour apport en azote des doses de 200 ou 400 kg par ha. Les plantes ont été écimées après la floraison. Le plan d'expérimentation par bloc a été déterminé 10 aléatoirement, et 10 pieds par parcelle, pris au hasard, ont fait l'objet de caractérisations chimiques.

Méthodes de dosage

15     Ions nitrate

Le dosage est réalisé sur un appareil à flux continu de type Technicon autoanalyser AA II C. 500 mg de tabac lyophilisé sont disposés dans 120 ml d'eau et agités pendant 30 min. La suspension est filtrée après que le volume ait été ajusté à 200 ml. L'échantillon prélevé est réduit en ions nitrite sur une colonne de cadmium puis est mélangé avec du réactif de Griess (sulfanilamide 10 g/l ; acide phosphorique concentré 10% ; N-naphtyl-éthylène-diamine 0,5 g/l). Après coloration, la densité opaque est lue à 560 nm et la teneur en ions nitrate est déterminée par référence à une gamme étalon réalisée à l'aide de nitrate de potassium.

25     Ions nitrite

Les teneurs en ions nitrite sont évaluées de manière analogue à celle utilisée pour le dosage des ions nitrate sur un appareil de type technicon autoanalyseur AA II. 500 mg de poudre de tabac sont disposés dans 50 ml de solution d'extraction (KCl 1% : sulfanilamide 0,5% ; triton X100 0,2%) et agités 30 min. La solution est filtrée sur papier Whatman, 10 ml du filtrat sont alors mis en présence de 500 mg de charbon actif afin de décolorer les extraits de tabac. L'échantillon est alors coloré par le réactif de Griess décrit précédemment. L'absorbance est lue à 560 nm et la teneur en ions nitrite est déterminée par référence à une gamme étalon.

#### Azote total

La mineralisation de la matière organique est réalisée dans un four à la température de 420°C. 500 mg de poudre de tabac sont digérés par 15 ml d'acide sulfureux concentré en présence de 1 g de catalyseur comprenant du sélenium (0.2 partie), du sulfate de cuivre (1 partie) et du sulfate de potasse (1 partie). Après 1 h dans le four, l'azote passe sous forme de sulfate d'ammonium. 50 ml d'eau sont alors ajoutés et l'ammoniaque formé est libéré par un excès de lessive de soude à 30%, puis distillé par entraînement à la vapeur dans un appareil semi-automatique Técator. L'ammoniaque est recueilli dans 20 10 ml d'acide borique à 2% et titré avec de l'acide sulfureux 0.05 N.

Les analyses après récolte montrent les tendances suivantes (voir figures 4 et 5, et tableau 2) :

1) Chez le type sauvage, l'effet d'une forte dose d'azote (400 kg/ha) est très net sur la croissance, mais les ions nitrate, malgré l'éclimage, restent stockés dans les feuilles (tab 2). L'accumulation d'ions nitrate est d'autant plus importante chez BB 16, que cette variété est un mutant déficient chlorophyllien.

2) La teneur en ions nitrate des cutters, représentative de l'accumulation chez le tabac, baissent significativement de 38% pour un tel apport en azote, alors que la baisse pour la lignée 34.2.5 BB 16 atteint 28%. Chez la lignée 30.51.2 PB D6 (fig.4), ces diminutions s'étaient selon les étages foliaires de 11% à 75% pour une baisse globale de 36%, alors que pour la lignée 34.2.5 BB 16 (fig.5), ces baisses varient de 26% à 39% pour une valeur globale de 33%. La diminution de la quantité d'ions nitrate accumulée dans la feuille est toutefois plus importante chez la lignée 34.2.5 BB 16 que chez la lignée 30.51.2 PB D6, cette variété accumulant relativement peu les ions nitrate.

3) Les ions nitrite s'ils sont nombreux dans les feuilles hautes chez la lignée 34.2.5 PB D6, diminuent dans les feuilles de la base (tab. 2). D'autre part, chez la lignée 30.51.2 PB D6, l'épuisement des ions nitrate semble être à l'origine de la baisse des ions nitrite. L'accumulation prévisible d'ions nitrite consécutive à la dérégulation du gène de la NR est donc limitée, et a tendance à s'estomper à maturité.

4) La richesse en azote des feuilles dépend directement de l'apport en azote initial, mais on peut remarquer que chez les individus transgéniques, l'application de la dose la

plus forte (400 kg d'azote/ha) est sans effet significatif sur la teneur en azote total (n° 2). Ce n'est seulement que sur la dose la plus faible (200 kg d'azote/ha) que l'on observe une différence (n° 2). La hausse de la teneur en azote total, qui est plus forte dans les feuilles de tête, se limite à 19% pour la lignée 30.51.2 PB D6 et 31% pour la lignée 5 34.2.5 BB 16. Bien que ce bilan soit limité aux feuilles, il semble tout de même que l'absorption d'azote soit plus importante.

En conclusion, les plantes transformées accumulent moins d'azote sous forme 10 unique que les plantes témoins. L'assimilation de l'azote chez les plantes transformées est plus efficace, et elles accumulent l'azote sous forme réduite.

**Tableau 2 . Teneurs en composés azotés des différents étages foliaires.**

		N1 = 200 kg d'azote/ha			N2 = 400 kg d'azote/ha		
		$NO_3^-$ (% de M.S.)	$NO_2^-$ (ppm)	azote total (% de M.S.)	$NO_3^-$ (% de M.S.)	$NO_2^-$ (ppm)	azote total (% de M.S.)
15	WT PB D6	Tête	0.07	70	2.18	1.12	42
		Médian	0.08	121	2.08	2.84	87
		Cutters	0.21	106	1.76	2.29	154
		Basse	0.24	276	1.58	1.88	214
	30.51.2	Tête	0*	48	2.60*	0.25*	59
		Médian	0.05*	96	2.34	2.54	88
		Cutters	0.10*	195	2.01	1.27	75*
		Basse	0.13*	216	1.71*	1.68	279
20	WT BB 16	Tête	0.34	50	3.30	2.46	47
		Médian	0.46	93	2.81	3.44	127
		Cutters	1.08	108	2.73	4.69	147
		Basse	1.49	276	2.60	7.18	302
	34.2.5	Tête	0.65	75	4.31*	1.81*	63
		Médian	0.84	143	3.36	2.11*	137
		Cutters	0.90	182	3.36*	3.37*	183
		Basse	1.72	207	2.90	4.39*	253
25	WT PB D6	Tête	0.07	70	2.18	1.12	42
		Médian	0.08	121	2.08	2.84	87
		Cutters	0.21	106	1.76	2.29	154
		Basse	0.24	276	1.58	1.88	214
	30.51.2	Tête	0*	48	2.60*	0.25*	59
		Médian	0.05*	96	2.34	2.54	88
		Cutters	0.10*	195	2.01	1.27	75*
		Basse	0.13*	216	1.71*	1.68	279
30	WT BB 16	Tête	0.34	50	3.30	2.46	47
		Médian	0.46	93	2.81	3.44	127
		Cutters	1.08	108	2.73	4.69	147
		Basse	1.49	276	2.60	7.18	302
	34.2.5	Tête	0.65	75	4.31*	1.81*	63
		Médian	0.84	143	3.36	2.11*	137
		Cutters	0.90	182	3.36*	3.37*	183
		Basse	1.72	207	2.90	4.39*	253

\* Effet significatif au seuil de 5% (test de Duncan)

EXEMPLE 6Production de laitues (*Lactuca sativum*) transformées

La teneur en Nitrate dans la laitue est très élevée et dépasse les niveaux acceptables pour la consommation si l'éclaircissement naturel de la culture est limité, comme c'est le cas dans les serres pendant l'automne, l'hiver et le printemps.

Une souche d'*Agrobactérium tumefaciens* (LBA-4404) contenant un plasmide vecteur binaire dérivé de pB1n19 (pBCSL16), contenant le gène de la Nitrate Réductase de tabac et le gène nptII (néomycine phosphotransférase) a été utilisée pour la production de l'étude transformée. Le gène de tabac était placé sous le contrôle du même promoteur 35S. Les constructions utilisées sont identiques à celles de l'Exemple 1.

Quatre variétés de laitues de serre (Flora, Cortina, Luxor et Evola) ont été utilisées pour les expériences de transformation. Après une culture des explants blessés et des Agrobactéries (cf. Michelmore et al. Pl. Cell Rep. 6:439 (1987)), plusieurs bourgeons ont été régénérés par callogenèse sur une culture sélective (100 mg/l de kanamycine). On a vérifié l'état transformé des bourgeons indépendants par un dosage de l'activité npt II. Plusieurs des plantes transformées ont été ensuite transférées dans une serre.

Etude de l'activité Nitrate Réductase et de la teneur de nitrate foliaire chez la laitue transformée (génération R0)

25

Les plantes transformées ont été élevées dans une serre dans des conditions favorables. Parmi les plantes, on observe des phénotypes variables.

Trois semaines après le transfert à la serre, les plantes ont été ombragées (approximativement 1.000 lux) pendant deux jours. Ensuite, des échantillons de feuilles (disques de 2 cm de diamètre) ont été prélevés pour une détermination de l'activité Nitrate Réductase selon une méthode connue (cf. Blom, Zandstra, Lamp Plant. Nutr., n° 6-611 (1983)). Le tableau 3 montre que, parmi les 104 plantes transformées, environ 13% montrent

35

une activité très élevée en Nitrate Réductase (plus de 400%) en comparaison avec des plantes témoins régénérées *in vitro*. Pour une vingtaine de transformants primaires, la teneur en nitrate a été mesurée selon une procédure classique décrite par Sen Donaldson (J. Assoc. Off. Anal. Chem. 5 61 : 1389 (1978)).

En général, la teneur en nitrate était réduite de près de 50% chez des plantes avec une activité Nitrate Réductase très élevée. Pour la plus grande part, l'activité npt II était très élevée dans ces plantes.

10 TABLEAU 3 : Nombres de plantes de laitue transgénique primaire (Ro) et son activité Nitrate Réductase (NR) mesuré *in vivo*

15	Génotype	Nombre de plantes avec une activité NR <sup>(1)</sup>			
		200%	200-400%	400%	Total
16	Flora	11	5	1	17
17	Luxor	24	9	7	40
18	Cortina	8	3	2	13
19	Evola	24	7	3	34
20	Total	67	24	13	104

(1) Activité relative en comparaison avec le niveau des témoins non transformés.

12

T A B L E A U 4  
ACTIVITÉ DE NITRATASE REDUCTASE ET TENEUR EN NITRATE DES SÉLATIONS TRANSFORMANTES PRIMAIRES (‰)

Génotype	Activité NR (relative)	Teneur en nitrate PPM	Teneur en nitrate réduction (%)
Flora témoin	100	3450	-
Flora transformant 4	> 300	1700	46
Flora transformant 32	≈ 200	2100	33
Luxor témoin	100	3730	-
Luxor transformant 31	> 300	2550	37
Luxor transformant 44	200 - 400	2100	44
Contina témoin	100	4120	-
Contina transformant 8	200 - 400	2100	49

FEUILLE DE REMPLACEMENT

23

La Figure 3 représente une séquence identifiée comme ci-dessous :

- Type de séquence : Nucléotide et sa protéine correspondante  
5 Longueur de la séquence : 3457 paires de bases  
Nombre de brins : simple  
Configuration : linéaire  
Type de molécule : ADN complémentaire (ADNc)  
ORIGINE  
10 Organisme : Plante, Nicotiana tabacum  
Source expérimentale : feuilles  
Nom de la lignée : N. tabacum cv. Xanthi XHFD8  
CARACTERISTIQUES  
de 1 à 143 paires de bases : séquence 5' non traduite (leader)  
15 de 144 à 2855 paires de bases : séquence codante pour l'apoenzyme nitrate réductase  
de 2856 à 3457 paires de bases : séquence 3' non traduite  
PROPRIETES  
ADNc du messager codant pour l'apoenzyme de la nitrate réductase  
20

25

30

35

Bibliographie

- BEVAN M. - 1984 - Binary Agrobacterium vectors for plant transformation  
Nucleic Acid Res. 12 : 8711-8712.
- 5
- BLOM-ZANDSTRA, M. AND EENINK, A.H. - 1986 - Nitrate concentration and reduction in different genotypes of lettuce J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111 : 908-911.
- 10 CAMPBELL 1988 - Higher plant Nitrate Reductase Curr. Top. Plant Biochem. Physiol. 7.1-15.
- CHOI, H., KLEINHOFS A., AND AN, G. (1989) Nucleotide sequence of rice nitrate reductase genes. Plant Molec. Biol. 13 : 731-733.
- 15 CHUPEAU M.C., BELLINI C., GUERCHE P., MAISONNEUVE B., VASTRA G.. CHUPEAU Y. (1989) Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. Bio/technology 7 : 503-508.
- 20 CLARK R.B. Physiology of cereals for mineral nutrient uptake, use, and efficiency, in "Crops as enhancer of nutrient use" Baligar V.C. and Duncan R.R. Eds Academic press, San Diego, London (1990) pp 131-210.
- CRAWFORD N. AND DAVIS R.W. Molecular analysis of nitrate regulation  
25 of nitrate reductase in squash and *Arabidopsis*, in "Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation" Wray J. and Kinghorn J.R. Eds Oxford Science Publications, Oxford, New York, Tokyo (1989) pp 328-337.
- CRAWFORD, N., SMITH, M., BELLISSIMO, AND DAVIS, R.W. (1988)  
30 Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5006-5010.

CURIE C., LIBOI T., BARDET C., GANDER E., MEDALE C., AXELOS M., LESCURE B. (1991) Cis and trans-acting elements involved in the activation of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factor EF-1 $\alpha$ . Nucleic Acid Res. 19 : 1305-1310.

5

DANIEL-VEDELE, F., DORBE, M.F., CABOCHE, M., AND ROUZE, P. (1989) Cloning and analysis of the nitrate reductase gene from tomato : a comparison of nitrate reductase protein sequences in higher plants. Gene 85 : 371-380.

10

HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOOYKAAS P.J.J. et SCHILPEROORT R.A.-1983 - A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature, 303, 179-180.

15

HOFF, T., STUMMANN, B.M., AND HENNINGSSEN, K.W. (1991) Cloning and expression of a gene encoding a root specific nitrate reductase in bean (*Phaseolus vulgaris*). Physiol. Plant; 82 : 197-204.

20

HORSH R.B. AND KLEE H.J. (1986) Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 4428-4432.

25

KAY R., CHAN A., DALY M., McPHERSON J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes Science 236 : 1299-1302.

30

KLEINHOFSS, A., WARNER R. L., HAMAT, H.B., JURIDEK, M., HUANG, C., AND SCHNORR, K. (1988) Molecular genetics of barley and rice nitrate reductases. Curr. Topics Plant Biochem. Physiol. 7 : 35-42.

MCCABE D.E., SWAIN W., MARTINELLI B., CHRISTOU P. (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/technology 6 : 923-927.

35

- NEUHAUS G., SPANGENBERG G., MITTELSTEN SCHIED O., SCHWEIGER H.G. (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of NDNA into microspore-derived embryos. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 30-36.
- 5 OSTREM J.A. AND COLLINS G.B. (1983) Genetic variation for nitrate concentration in *Nicotiana tabacum* L.J. *Heredity* 74 : 431-434.
- ROCHA-SOSA M., SONNEWALD U., FROMMER W., STRATMAN M., SCHELL J., WILLMITYZER L. (1989) Both developmental and metabolic signals 10 activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 8 : 23-29.
- SAUX C., LEMOINE Y., MARION-POLL A., VALADIER M.H., DENG M., MOROT-GAUDRY J.F. (1987) Consequences of absence of nitrate reductase activity on photosynthesis in *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Plant. 15 Physiol.* 84 : 67-72.
- STOCHER R.J., SCHILLITO R., SAUL M., PASKOWSKI J., POTRYKUS I. (1986) Co-transformation of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer. *Bio/technology* 4 : 1093-1096.
- 20 THOMAS S.P. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 : 442-447.
- 25 THOMSON W.F. AND WHITE M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 : 423-466.
- VAUCHERET, H., VINCENT, M., KRONENBERGER, J., CABOCHE, M., AND 30 ROUZE, P. (1989) Molecular cloning and characterization of the two homeologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 216 : 10-15.

VINCENTI M. et CABOCHE M. - 1991 - Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. EMBO J., 10, 1027-1035.

5 WARNER R.L. AND HUFFAKER R.C. (1989) Nitrate transport is independent of NADH and NADPH nitrate reductases in barley seedlings. Plant Physiol. 91 : 947-953.

WRAY - 1986 - The molecular genetics of higher plant nitrate assimilation  
10 - In. A genetic approach to Plant Biochemistry, A.D. Blonstein and P.J. King, eds (Springer, N.Y.), pp. 101-157.

ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M.,  
SCHELL J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant  
15 cells without alteration of their normal regeneration capacity EMBO J 2 : 2143-2150.

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Procédé pour accroître la précocité d'une plante et/ou abaisser la teneur en nitrates stockés dans la plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression de la Nitrate Réductase dans la plante.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on introduit dans le génome de la plante un gène étranger codant pour la Nitrate Réductase dans des conditions permettant son expression.
- 10 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le gène codant pour la Nitrate Réductase provient d'un ADNc de plantes dicotylédones codant pour la Nitrate Réductase.
- 15 4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce qu'on infecte des explants par une souche d'Agrobactérium tumefaciens ou Agrobactérium Rhizogenèse transformée par un plasmide dans lequel est inséré ledit gène étranger codant pour la Nitrate Réductase placé sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène.
- 20 5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans un plasmide dérivé du plasmide de Ti ou R1.
6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle d'un promoteur hétérologue fonctionnel dans la plante transformée.
- 25 7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est dérivé du gène Nia 2 de la Nitrate Réductase du tabac.
8. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du Ca MV.
- 30 9. Procédé selon l'une des revendications 2 à 8 caractérisé en ce que le gène étranger codant pour la Nitrate Réductase est inséré dans le plasmide pBin 19.

29

10. Plante à précocité accrue obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Plante à teneur en nitrates stockés réduite obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

5 12. Plante selon la revendication 10 ou 11 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une plante choisie parmi le tabac, la laitue, l'épinard, la carotte, ou les choux.

10

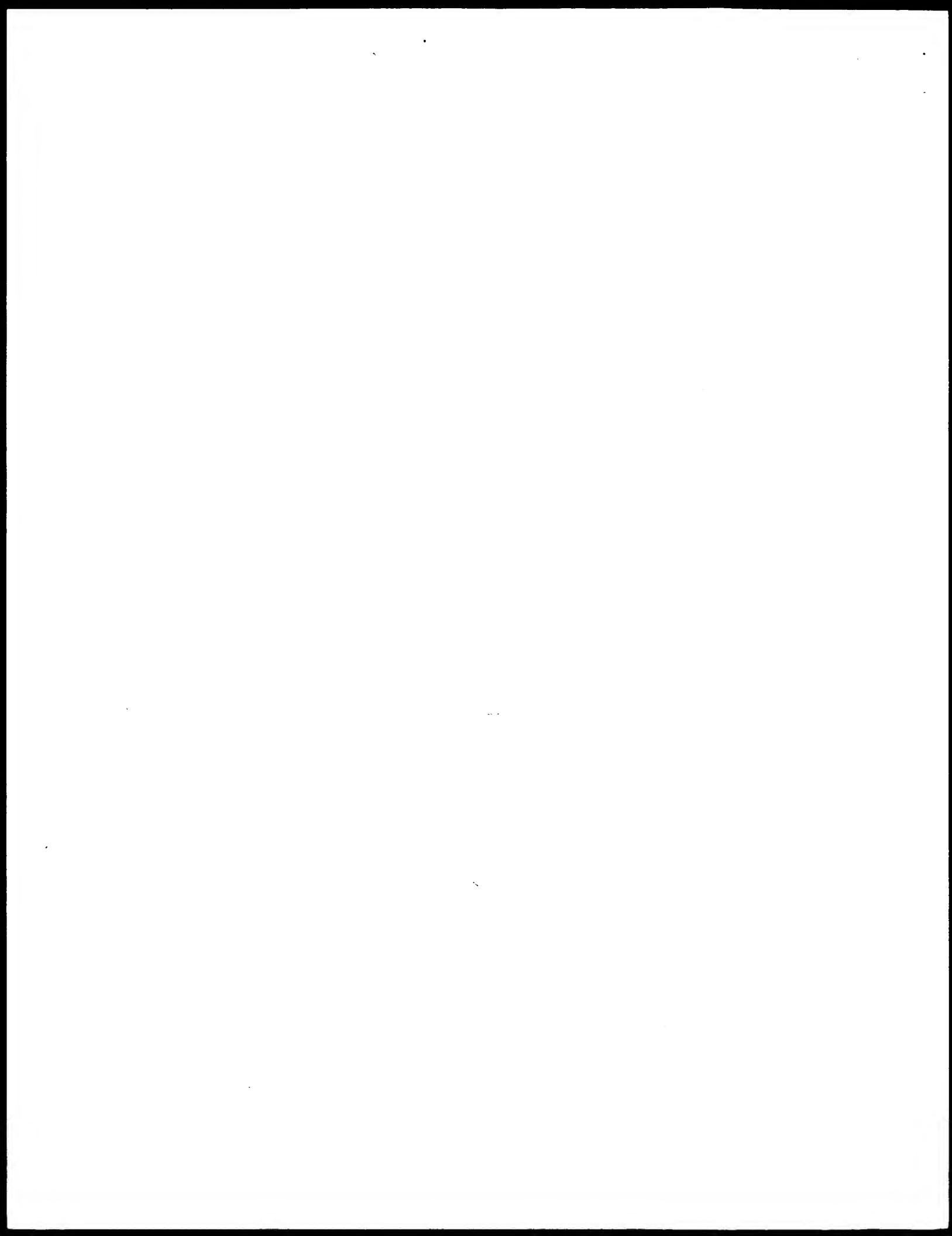
15

20

25

30

35



1/6

FIG. 1

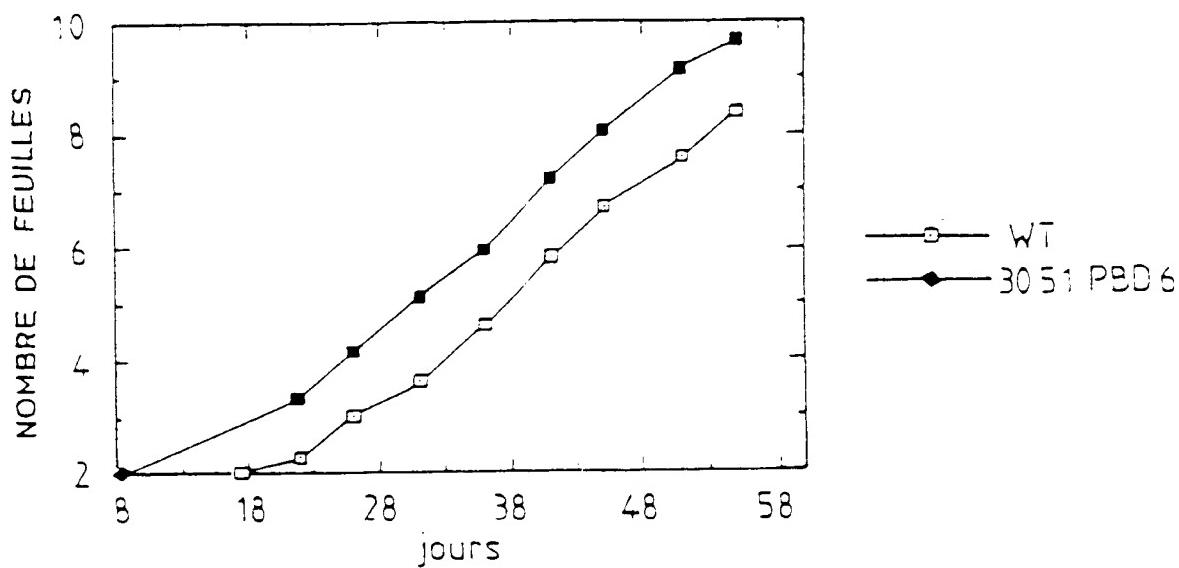
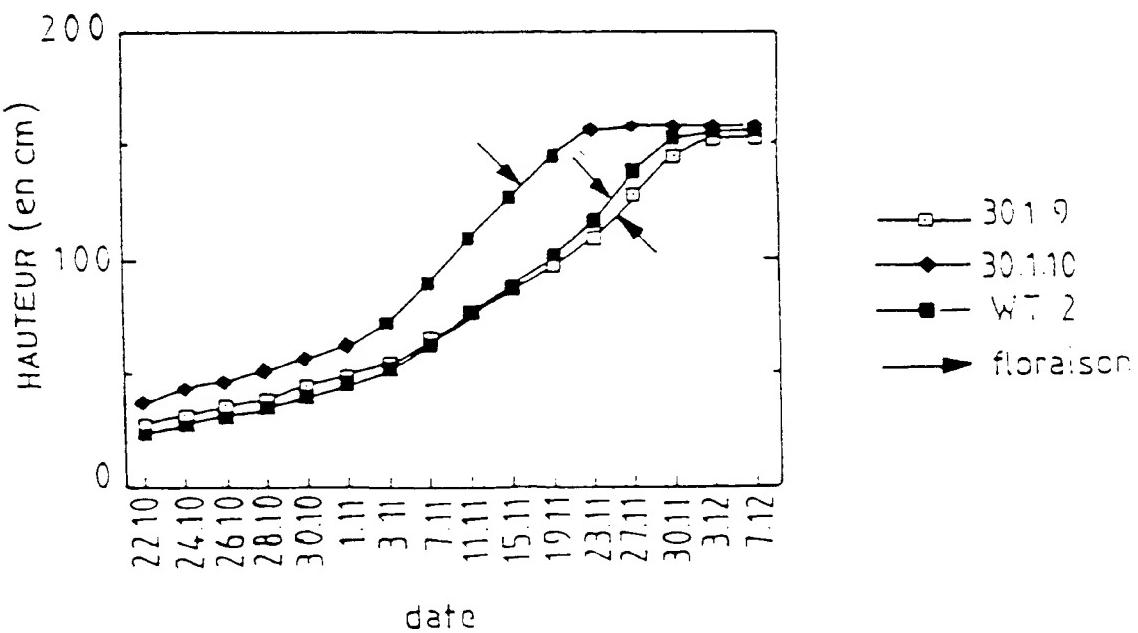
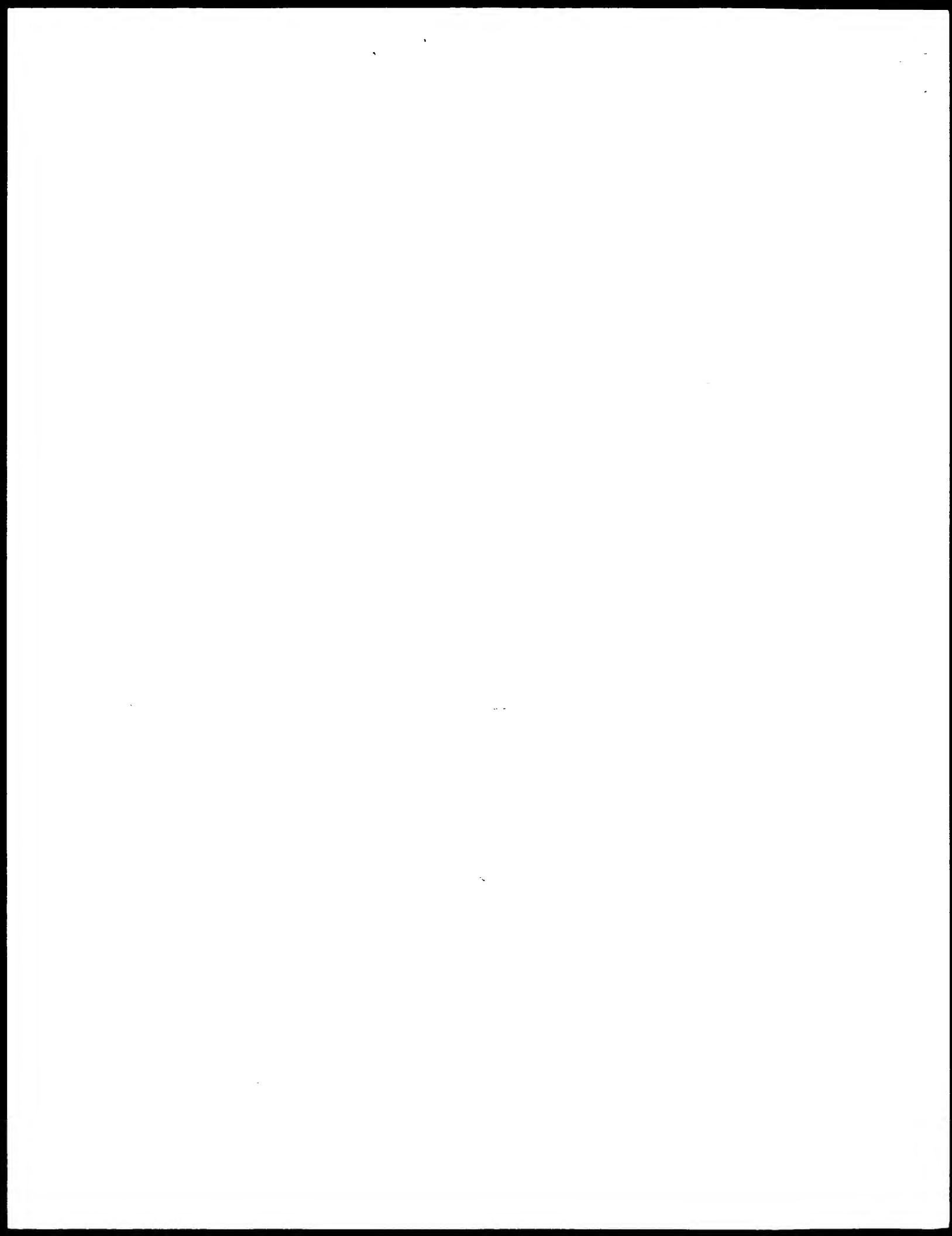


FIG. 2

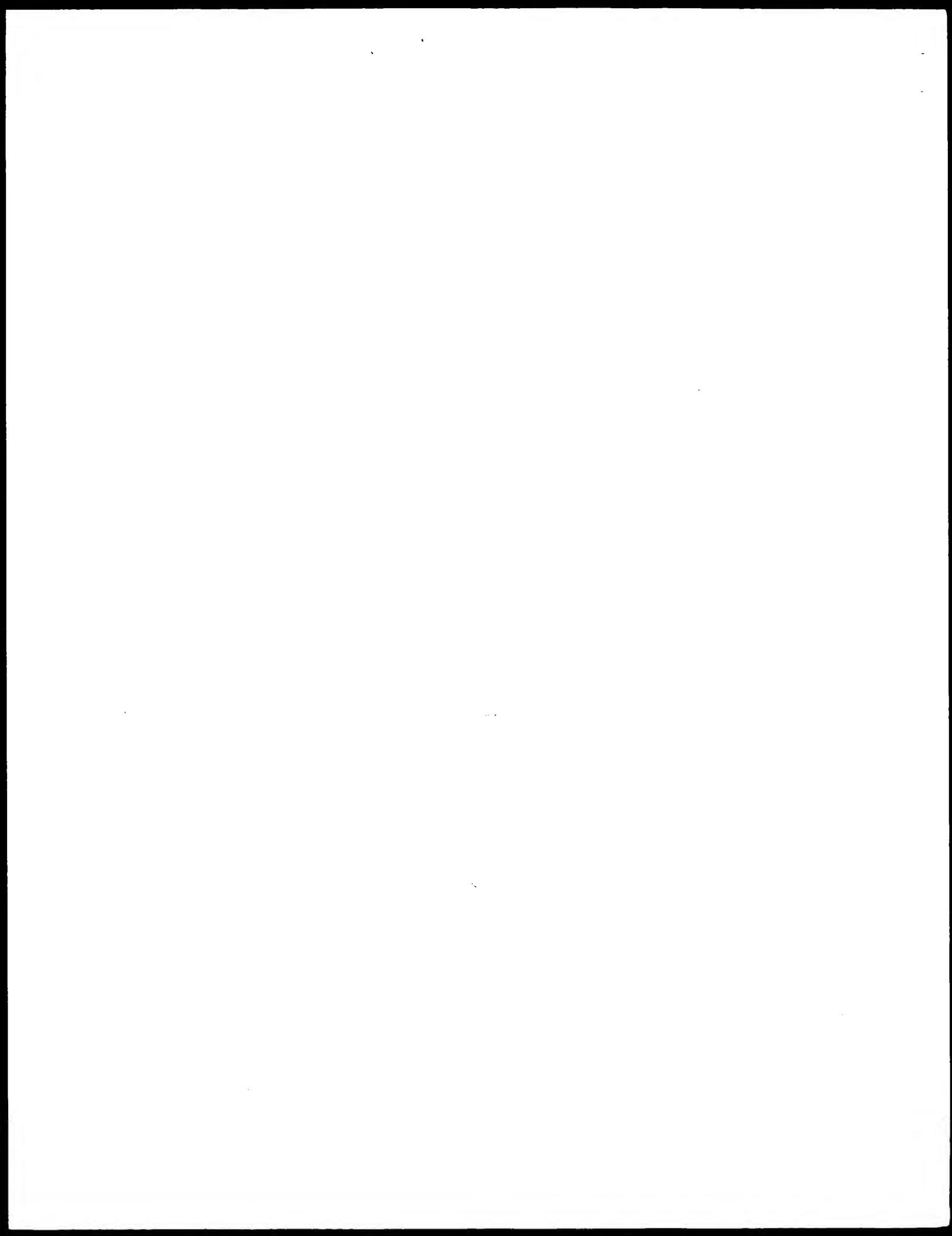




2/6

SAGCTCGTT CCCAAACAGA ACAAGAAAAAT CAAATTCGG AGAGAGAGAG AGAGAAAATAT	59
TTTGGAGAGAG AAAATACAGAA AATCTCTTCTT CCTTCTTTCC TTTTTTTTC AATCCCCATT	119
CATATTCCTT TTTTGAATA ATCT ATG GCG GCA TCT GTC GAA AAC AGG CAG Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln	170 9
TTC AGT CAC CTA GAA GCC GGT TCA TCC CGG TCT TTC AAG CCC CGG Phe Ser His Leu Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ser Phe Lys Pro Arg	215 24
TCT GAT TCC CCG GTT CGT GGC TGC AAC TTC CCT TCG CCC AAC AGT Ser Asp Ser Pro Val Arg Gly Cys Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser	250 39
ACT AAT TTC CAA AAG AAA CCA AAT TCC ACC ATT TAC CTT GAT TAC Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr	305 54
TGG TCG AGT GAA GAC GAC GAT GAT GAC GAA AAA AAT GAG TAC Ser Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu Lys Asn Glu Tyr	350 69
CTT CAA ATG ATT AAA AAA GGG AAT TCA GAG TTA GAG CCA TCT GTT Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu Glu Pro Ser Val	395 84
CAT GAC ACT AGG GAC GAA GGT ACC GCT GAT AAT TGG ATT GAA CGC His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp Ile Glu Arg	440 99
AAC TTT TCC ATG ATT CGT CTC ACC GGA AAG CAT CCA TTT AAC TCC Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe Asn Ser	485 114
GAA CCA CCG TTG AAC CGG CTC ATG CAC CAC GGC TTT ATC ACA CCG Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr Pro	530 129
CTC CCA CTT CAT TAC GTT CGT AAC CAT GGA CCG GTT CCC AAG GGC Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly	575 144
ACG TGG GAT GAC TGG ACC GTG GAA GTC ACG GGA CTA GTG AAG CGT Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg	620 159
CCT ATG AAA TTC ACA ATG GAC CAG TTG GTT AAC GAA TTC CCT TGT Pro Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys	665 174
AGA GAA TTG CCC GTT ACG CTT GTT TGT GCT GGC AAT CGA AGG AAA Arg Glu Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys	710 189
GAA CAG AAC ATG GTT AAA CAA ACC ATT GGT TTC AAC TGG GGC GGC Glu Gln Asn Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala	755 204
GCT GCC GTT TCA ACA ACG ATA TGG CGC GGG GTA CCC CTC CGC GCT Ala Ala Val Ser Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala	800 219
TTG CTA AAA CGG TGC GGT GTT TTT AGC AAG AAT AAA GGG GCG CTT Leu Leu Lys Arg Cys Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu	845 234
AAT GTT TGC TTC GAA GGA GCT GAT GTG TTG CCC GGA GGT GGT GGT Asn Val Cys Phe Glu Gly Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly	890 249
TCA AAG TAT GGA ACC AGC ATT AAG AAG GAA TTT GCA ATG GAT CCA Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro	935 264

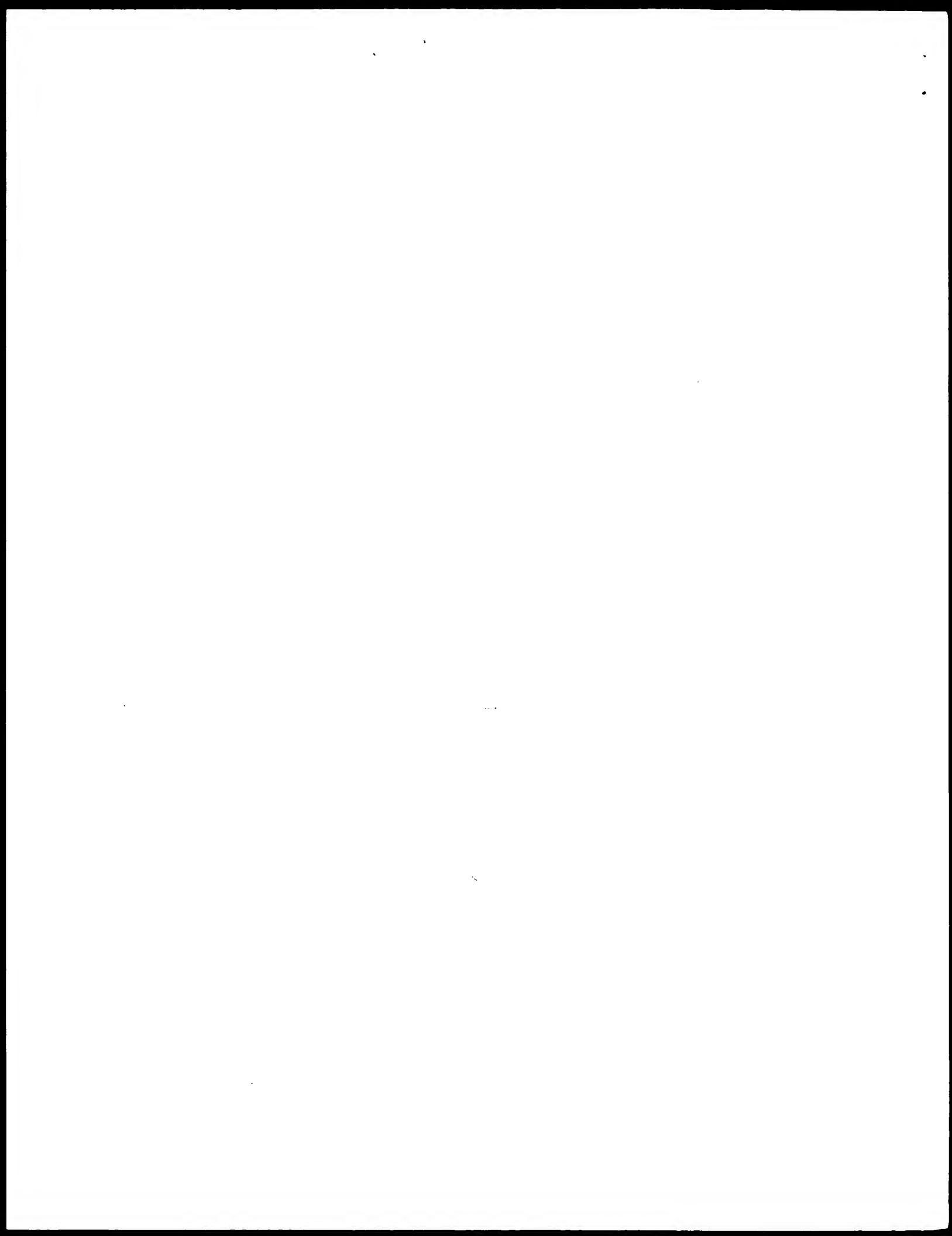
FIG 3 (1ère Planche)



3/6

GCA CGA GAT ATC ATC GTC GGC TAC ATG CAG AAC GGA GAA AAA TTG Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr Met Glu Asn Gly Glu Lys Leu	980 279
GCA CCC GAC CAC CGG TTT CCA GTC CGA ATG ATA ATT CCA GGA TTC Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg Met Ile Ile Pro Gly Phe	1025 294
ATT GCA GGA AGA ATG GTG AAA TGG ATA AAG AGG ATT ATA GTC ACC Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys Arg Ile Ile Val Thr	1070 309
ACC GAA GAA TCA GAC AGC TAT TAT CAT TTC AAG GAC AAT AGA GTT Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys Asp Asn Arg Val	1115 324
CTT CCT CCC CAT GTT GAT GCT GAA CTT GCA AAT ACC GAA GCA TGG Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr Glu Ala Trp	1160 339
TGG TAC AAG CCA GAG TAT ATC ATC AAT GAG CTT AAT ATT AAC TCT Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile Asn Ser	1205 354
GTC ATT ACG ACG CCG TGT CAT GAA GAA ATT TTG CCA ATT AAC GCC Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn Ala	1250 369
TGG ACG ACT CAG CGA CCT TAC ACG TTG AGG GGC TAT TCT TAT TCT Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser	1295 384
GGC GGA GGG AAA AAA GTA ACG CGA GTA GAA GTG ACG TTG GAT GGA Gly Gly Gly Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly	1340 399
GGA GAA ACA TGG CAA GTT AGC ACA CTA GAT CAC CCA GAG AAG CCC Gly Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro	1385 414
ACC AAA TAT GGC AAG TAC TGG TGT TGG TGC TTT CGG TCA CTC GAG Thr Lys Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu	1430 429
GTT GAG GTG TTA GAC TTG CTC AGT GCT AAA GAA ATT GCT GTT CGA Val Glu Val Leu Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg	1475 444
GCT TGG GAT GAG ACC CTC AAT ACT CAA CCC GAG AAG CTT ATT TGG Ala Trp Asp Glu Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp	1520 459
AAC GTC ATG GGA ATG ATG AAT AAT TGC TGG TTC CGA GTA AAG ATG Asn Val Met Gly Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met	1565 474
AAT GTG TGC AAG CCT CAC AAG GGA GAG ATT GGA ATA GTG TTT GAG Asn Val Cys Lys Pro His Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu	1610 489
CAT CGG ACT CAA CCT GGA AAC CAA TCA GGT GGA TGG ATG GCG AAG His Pro Thr Gln Pro Gly Asn Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys	1655 504
GAG AGA CAT TTG GAG ATA TCA GCA GAG GCA CCT CAA ACA CTA AAG Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys	1700 519
AAG AGT ATC TCA ACT CCA TTC ATG AAC ACA GCT TCC AAG ATG TAC Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met Asn Thr Ala Ser Lys Met Tyr	1745 534
TCC ATG TCC GAG GTC AGG AAA CAC AGC TCT GCT GAC TCT GCT TGG Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser Ala Asp Ser Ala Trp	1790 549
ATC ATA GTC CAT GGT CAT ATC TAT GAC GCC ACG CGT TTC TTG AAA Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr Arg Phe Leu Lys	1835 564
GAT CAC CCT GGT GGG ACT GAC AGC ATT CTC ATC AAT GCT GGC ACT Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn Ala Gly Thr	1880 579

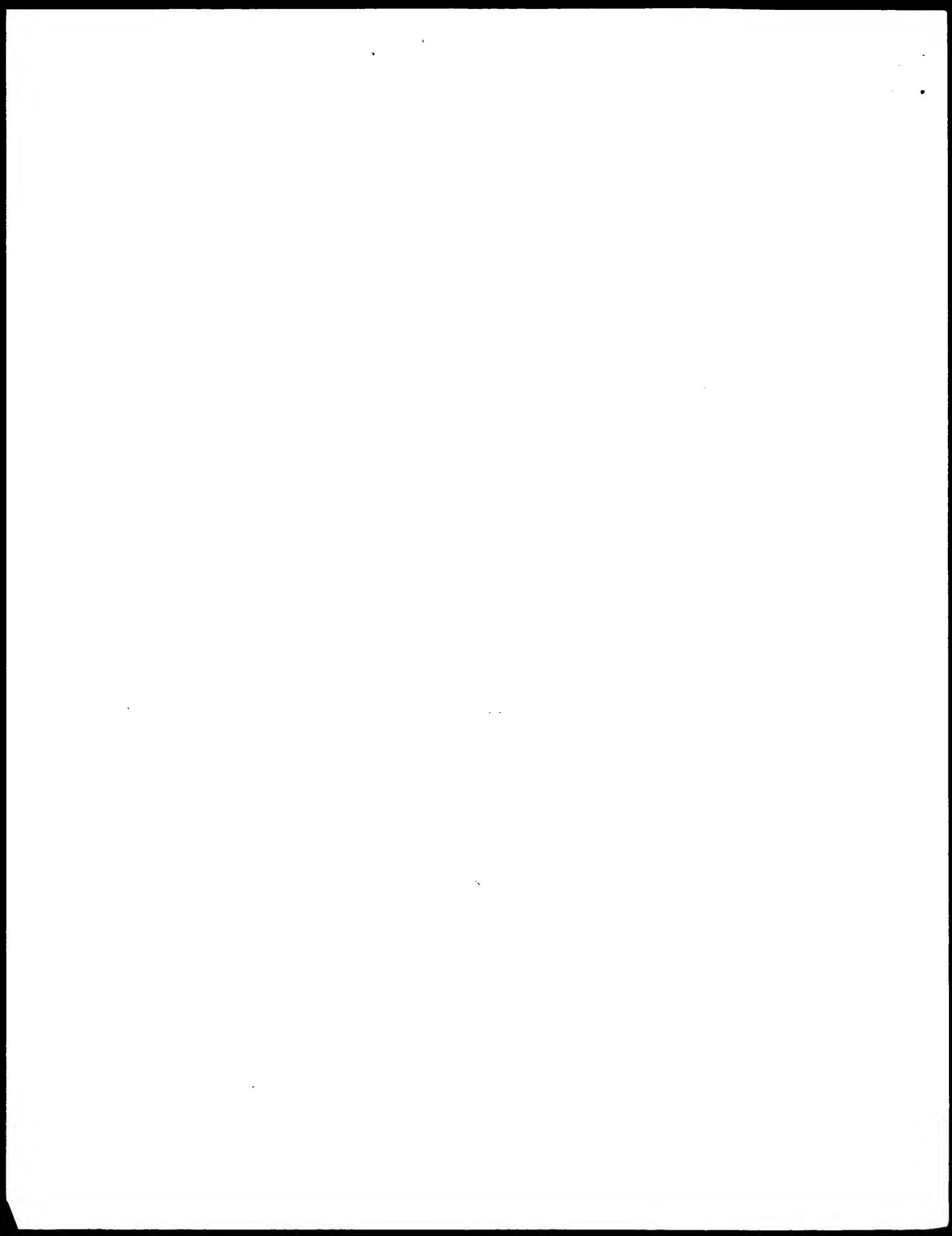
FIG 3 (2ème planche)



4/6

GAT TCC ACT GAG GAA TTT GAT GCA ATT CAT TCT GAT AAG GCT AAG Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys Ala Lys	1925 594
AAG CTC TTG GAG GAT TTC AGG ATT GGT GAA CTC ATA ACT ACT GGT Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr Gly	1970 609
TAC ACC TCT GAC TCT CCT GGC AAC TCC GTG CAC GGA TCT TCT TCC Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser	2015 624
TTC AGC AGC TTT CTA GCA CCT ATT AAG GAA CTT GTT CCA GCG CAG Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln	2060 639
AGG AGT GTG GCC CTA ATT CCA AGA GAG AAA ATC CCA TGC AAA CTC Arg Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu	2105 654
ATC GAC AAG CAA TCC ATC TCC CAT GAT GTT AGG AAA TTT CGA TTT Ile Asp Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe	2150 669
GCA TTG CCC TCT GAG GAT CAA GTC TTG GGC TTG CCT GTT GGA AAA Ala Leu Pro Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys	2195 684
CAT ATC TTC CTC TGT GCC GTT ATT GAC GAT AAG CTC TGC ATG CGC His Ile Phe Leu Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg	2240 699
GCT TAC ACG CCT ACT AGC ACG ATC GAT GAG GTG GGG TAC TTC GAG Ala Tyr Thr Pro Thr Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu	2285 714
TTG GTT GTC AAG ATA TAC TTC AAA GGA ATT CAC CCT AAA TTC CCC Leu Val Val Lys Ile Tyr Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro	2330 729
AAT GGA GGG CAA ATG TCA CAG TAT CTT GAT TCT ATG CCG TTA GGG Asn Gly Gln Met Ser Gln Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly	2375 744
TCA TTT CTC GAC GTG AAA GGT CCA TTA GGT CAC ATT GAA TAC CAA Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln	2420 759
GGA AAG GGA AAT TTC TTA GTT CAT GGC AAA CAG AAG TTT GCC AAG Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly Lys Gln Lys Phe Ala Lys	2465 774
AAG TTG GCC ATG ATA GCA GGT GGA ACA GGA ATA ACT CCA GTG TAT Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Thr Gly Ile Thr Pro Val Tyr	2510 789
CAA GTC ATG CAG GCA ATT CTG AAA GAT CCA GAA GAT GAC ACA GAA Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu Asp Asp Thr Glu	2555 804
ATG TAT GTG GTG TAT GCT AAC AGA ACA GAG GAT GAT ATT TTA CTT Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp Ile Leu Leu	2600 819
AAG GAA GAG CTT GAT TCA TGG GCT GAG AAA ATT CCA GAG AGG GTT Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu Arg Val	2645 834
AAA GTT TGG TAT GTG GTT CAG GAT TCT ATT AAA GAA GGA TGG AAG Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp Lys	2690 849
TAC AGC ATT GGT TTT ATT ACA GAA GCC ATT TTG AGA GAA CAT ATC Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile	2735 864
CCT GAG CCA TCT CAC ACA ACA CTG GCT TTG GCT TGT GGA CCA CCT Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro	2780 879
CCT ATG ATT CAA TTT GCT GTT AAT CCA AAC TTG GAG AAG ATG GGC Pro Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly	2825 894

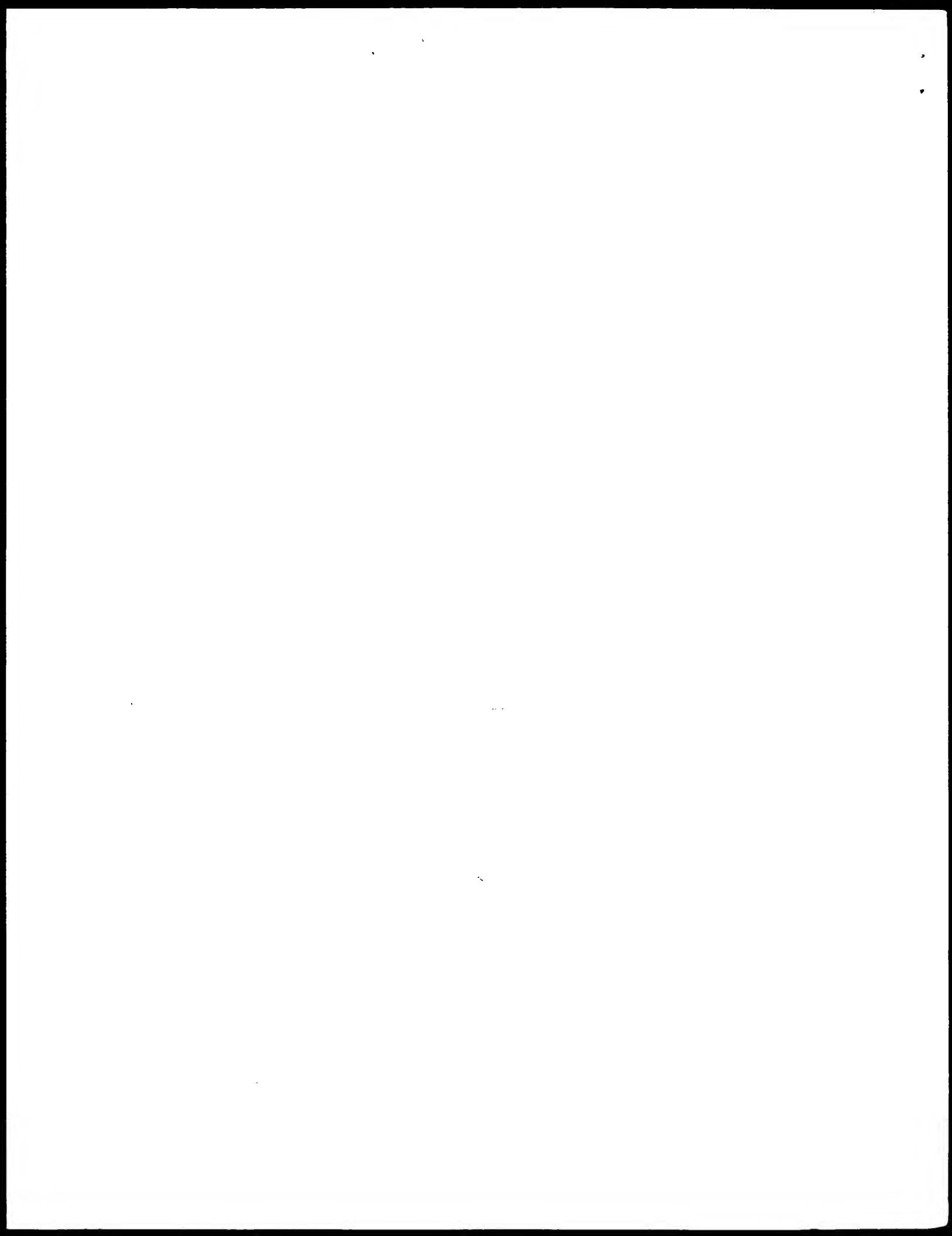
FIG 3 (3ème planche)



5/6

TAT GAC ATT AAG GAT TCC TTA TTG GTG TTC TAATTTAAAAACAAAACAA	2875
Tyr Asp Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe	904
TATCTGCAGGAATAAATTTTTTTTCCCCCTATCAGTTGTACATATTGTATTGGTTA	2935
TCACCCCCATGTACTACGTAGTGTAGTTCTACATTTTATTTTTAGAATTTTT	2995
TAAACCTTAGGATATAAAGGTTTCTTCCAACAAAGTGATTCTTAGGGAAGAAATGT	3055
AC13TACTGTACTAGTATGTCTAACGCCAAAGTTGTAATGTTACCATGACAAATTGTAT	3115
TCAATTCCCTCATGGAATAGTAACATTGTGTTCATGTGTCTTCTGTAAGCGATCTCAA	3175
ATATCAATGTATATATATAGTAATTGCAAACCATTGTTCTTCCCAGTGTAGTTAACT	3235
ACTCTTCTTAGCTTCTAGTCTCTGGTGAATATTTTTCTATAACTCTTAATTAA	3295
TACGGCCTTAATAAGAGAAAAGTTAAACCACGAATATCATTATGCAGACGTATAGGT	3355
ATTAACTACTTTGAAAAAAAATCTATTTCTTATGTGGTCCTCAAAATAATATTC	3415
TAGAACCTTTGTATATTCCCTTTAACTTCTATTAGTTT	3457

FIG 3 (4ème planche)



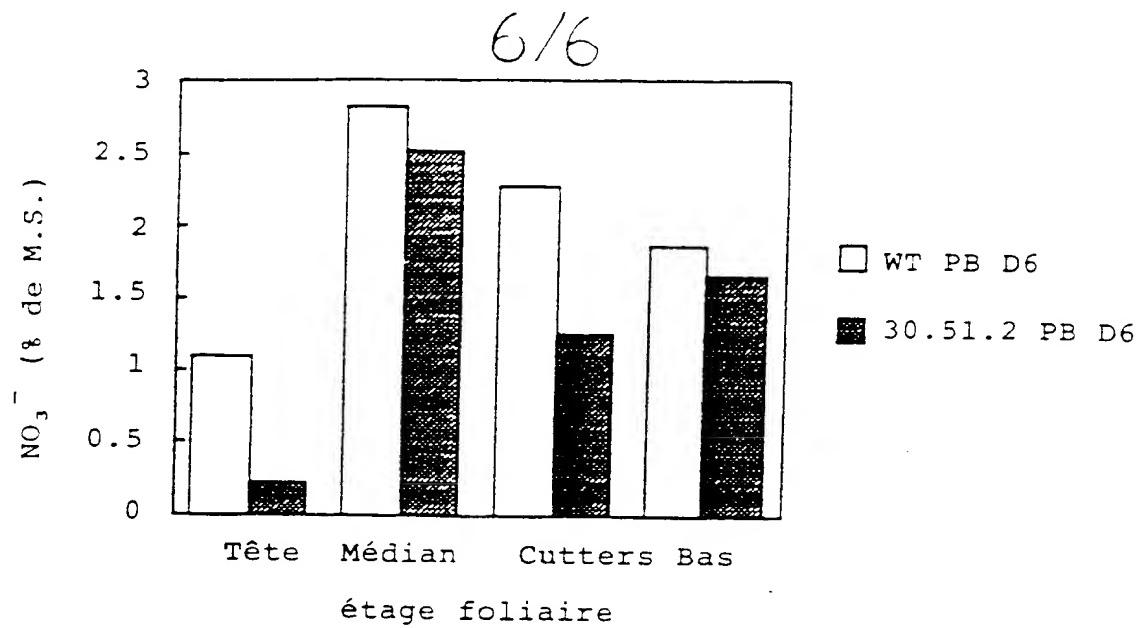


FIGURE 4

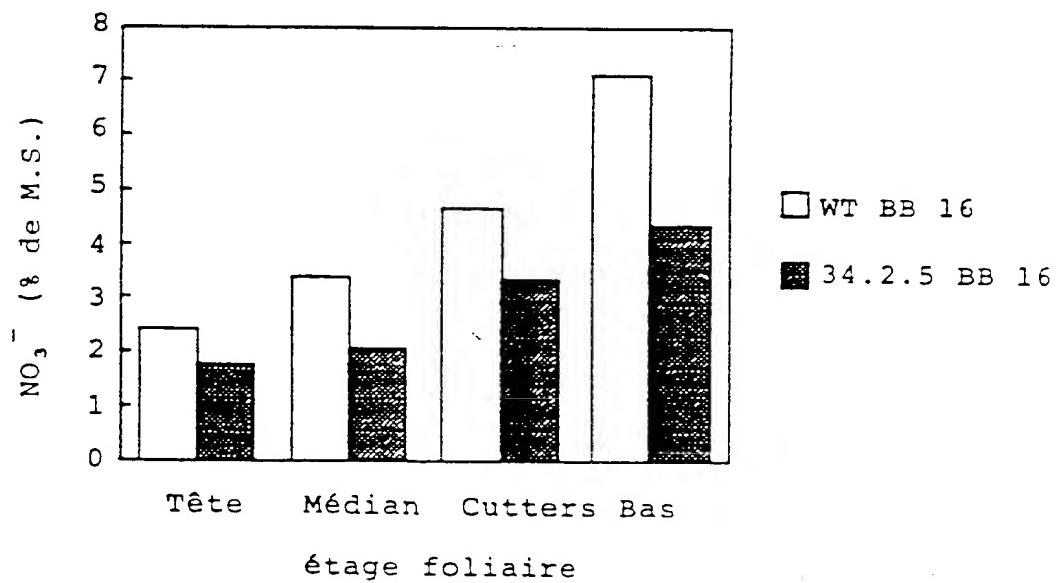


FIGURE 5

